

Aus dem Institut für Zytobiologie und Zytopathologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Analyse von posttranslationalen Modifikationen an Fe/S-Proteinen
und Protein-Protein-Interaktionen zwischen
Fe/S-Assemblierungsfaktoren in Mitochondrien von *S. cerevisiae***



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stefan Christ

aus Höhr-Grenzhausen

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 22.10.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr PD Dr. U. Mühlhoff

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. U. Maier

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG.....	4
ABSTRACT.....	5
EINLEITUNG.....	6
Klassifizierung von Fe/S-Cluster-Kofaktoren	6
Lokalisation und Aufgaben von Fe/S-Clustern	7
Welche Systeme von Fe/S-Cluster assemblierenden Maschinerien gibt es?	9
Die mitochondriale ISC-Maschinerie im Modellorganismus <i>S. cerevisiae</i>	10
Die cytosolische CIA-Maschinerie und die Rolle von Atm1 in der ISC-Export-Maschinerie.....	13
Zielsetzung der Arbeit.....	15
ERGEBNISSE.....	17
Defekte in der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Cluster Assemblierung induzieren eine Cystein S-Polythiolierung auf Fe/S-Zielproteinen	17
1.1 Defekte in der mitochondrialen ISC-Maschinerie führen zu spezifischen Veränderungen in der Zugänglichkeit der Cysteinseitenketten mitochondrialer Fe/S-Proteine	17
1.2 Reinigung des bakteriellen [4Fe-4S]-Proteins HiPIP aus den Mitochondrien von <i>S. cerevisiae</i>	18
1.3 Mitochondriale Fe/S-Proteine akkumulieren eine Schwefel-Spezies auf den Thiol-Gruppen ihrer Cysteinliganden in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie	24
1.4 Physiologische Relevanz der Cystein-SH-Modifikation von Apo-Fe/S-Proteinen	28
1.5 Wer ist für die Einführung einer Poly-S-Thiolierung in Apo-Fe/S-Proteine verantwortlich?	34
Etablierung eines Split-Luciferase-Testsystems für Studien der Protein-Protein-Interaktion mitochondrialer Proteine.....	37
2.1 Hintergrund.....	37
2.2 Das <i>Renilla</i> Split-Luciferase-Testsystem.....	38
2.3 Plasmide zur Herstellung von Fusionsproteinen für ein Split-Luciferase-Testsystem.....	40
2.4 Charakterisierung des Split-hRluc-Systems	43
2.5 Dynamik des trimeren Komplexes aus Isa1, Isa2 und Iba57	48
2.6 Defekte in der ISC-Maschinerie beeinträchtigen den Isa1, Isa2, Iba57-Komplex	50
2.7 Protein-Protein Interaktionsstudien der späten ISC-Maschinerie mit Hilfe des Split-Luciferase-Testsystems	55
DISKUSSION.....	62
Teilprojekt I: Defekte in der ISC-Maschinerie führen zur Akkumulation von mitochondrialen Apo-Fe/S-Zielproteinen mit abgeschirmten Cysteinliganden.....	62
Teilprojekt II: Analyse der Interaktionsdynamik der Teilkomponenten der späten ISC-Maschinerie mit Hilfe eines <i>Renilla</i> Split-Luciferase-Testsystems	68
MATERIAL UND METHODEN	75

4.1 Materialien	75
4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	75
4.1.2 Geräte	77
4.2 Hefestämme	79
4.3 Liste der verwendeten Plasmide	80
4.4 Oligonukleotide zur endogenen Modifikation von Genen in <i>S. cerevisiae</i>	83
4.4.1 Teilprojekt I: Defekte in der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierung induzieren eine Cystein-S-Poly-Thiolierung auf Fe/S-Zielproteinen	83
4.4.2 Teilprojekt II: Etablierung eines Split-Luciferase-Testsystems für Studien der Protein-Protein-Interaktion mitochondrialer ISC-Komponenten	84
4.5 Molekularbiologische Methoden	88
4.6.1 Manipulation von DNA und Polymerasekettenreaktion (PCR)	88
4.5.2 Kolonie PCR	89
4.5.3 Kultivierung und genetische Manipulation von <i>E. Coli</i>	89
4.5.4 Agarose-Gelelektrophorese	89
4.5.5 Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen	89
4.6 Zellbiologische Methoden	90
4.6.1 Kultivierung von Hefen	90
4.6.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	92
4.6.3 Präparation von Mitochondrien	92
4.6.4 Präparation von Hefe-Gesamtzellextrakten mit Glasperlenaufschluss	92
4.7 Biochemische Methoden	92
4.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford-Methode	92
4.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	93
4.7.3 „semidry“-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)	93
4.7.4 Färbetechniken von SDS-Gelen und von Western-Blots	93
4.7.5 Immundetektion	94
4.7.6 Cysteinmodifikation mit AEDANS-Reagenz	95
4.7.7 Cysteinmodifikation mit Maleimide-PEG ₁₁ -Biotin	95
4.7.8 Cysteinmodifikation mit Maleimide-PEG ₂ -Biotin	98
4.7.9 Proteinreinigung von HiPIP aus Mitochondrien von <i>S. cerevisiae</i>	101
4.7.10 Massenspektrometrische Analyse von gereinigten Fe/S-Proteinen	104
4.7.11 oxICAT	104
4.7.12 <i>De novo</i> Insertion von Fe ⁵⁵ in Fe/S-Proteine <i>in vivo</i>	104
4.7.13 Split-Luciferase-Messungen	105
4.7.14 Enzymatische Messungen	105
LITERATURVERZEICHNIS	107
ANHANG	119
Abkürzungsverzeichnis	119
Liste Hefestämme Teilprojekt II	120

Verzeichnis der akademischen Lehrer	125
Danksagung	126

Zusammenfassung

In *S. cerevisiae* sind drei Proteinmaschinerien für die *de novo* Biogenese von Fe/S-Clustern und deren Inkorporation in Zielproteine verantwortlich: die mitochondriale ISC- (iron sulfur cluster) Assemblierungsmaschinerie, das ISC-Export-System sowie das CIA- (cytosolic iron-sulfur-protein assembly) System. Der Mechanismus der *de novo* Biogenese eines [2Fe-2S]-Clusters durch die Komponenten der Kern-ISC-Maschinerie ist bereits gut untersucht. Wenig ist hingegen über den Prozess der [2Fe-2S]- nach [4Fe-4S]-Cluster-Konversion bekannt, der durch die späten ISC-Komponenten katalysiert wird sowie über die Mechanismen, mit denen Fe/S-Zielproteine an die ISC-Maschinerie rekrutiert werden. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit diesen zwei Teilaspekten aus dem letzten Schritt der Fe/S-Cluster-Biogenese. Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurde analysiert, in welcher Form Apo-Fe/S-Proteine an die ISC-Maschinerie herangeführt werden. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, ob und wie die Zelle die freien Thiolgruppen von Fe/S-Cluster ligierenden Cysteinen in der Apo-Form vor oxidativen Modifikationen schützt. Mittels massenspektrometrischer Analyse wurde gezeigt, dass mitochondriale Fe/S-Proteine in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie mit mehreren Massenaddukten von +30 bis +32 Da modifiziert werden. Bei diesen Modifikationen handelt es sich wahrscheinlich um Schwefeladditionen an die Cysteinliganden der Apo-Fe/S-Proteine in Form von verbrückenden Polysulfiden. Diese Modifikationen treten ebenfalls in geringem Maße unter normalen Wachstumsbedingungen in Wildtypzellen auf und werden verstärkt unter Eisenmangelbedingungen beobachtet. Da die Cysteinaddukte reduktiv entfernt werden können, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei der Modifikation der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen mit Per- oder Polysulfiden um einen physiologischen Schutzmechanismus vor oxidationsbedingter Degradation handelt.

Im zweiten Teilprojekt wurde ein neues System zur systematischen Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in Mitochondrien von *S. cerevisiae* entwickelt um Interaktionen der späten ISC-Komponenten Isa1, Isa2 und Iba57 zu charakterisieren. Die Daten dieses *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems legen den Schluss nahe, dass Isa1, Isa2 und Iba57 einen trimeren Komplex ausbilden, dessen Assemblierung *in vivo* von einer funktionierenden ISC-Maschinerie abhängig ist. Isa1 und Isa2 interagieren weiterhin mit dem Monothiol Glutaredoxin Grx5, welches den in der frühen ISC-Maschinerie synthetisierten [2Fe-2S]-Cluster von dem Gerüstprotein Isu1 übernimmt und an [2Fe-2S]-Zielproteine weiterreicht. Die Interaktion mit Isa1 und Isa2 spricht dafür, dass Grx5 seinen [2Fe-2S]-Cluster ebenfalls an die späte ISC-Maschinerie zur Konversion in einen [4Fe-4S]-Cluster weiterreichen könnte. Zudem interagierte das mitochondriale Ferredoxin Yah1 mit den späten ISC-Komponenten. Dies könnte bedeuten, dass Yah1 Elektronen für einen reduktiven Reaktionsschritt während der Fe/S-Cluster-Konversion bereitstellt. Da das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem zu einer

konzentrationsabhängigen Assemblierung der Teildomänen in Mitochondrien tendiert, sollten die hier beobachteten Interaktionen mit einer weiteren Methode verifiziert werden.

Abstract

In *S. cerevisiae*, three distinct protein machineries are responsible for the *de novo* biogenesis of Fe/S-clusters and their incorporation into target proteins: the mitochondrial ISC- (iron_sulfur_cluster) machinery, the ISC-export system and the CIA- (cytosolic_iron-sulfur-protein_assembly) system. The mechanism of the *de novo* biogenesis of a [2Fe-2S]-cluster by the core components of the ISC-machinery is well characterized on a functional level. On the contrary, little is known about the process of Fe/S-cluster conversion, catalyzed by the late acting ISC-components, or how Fe/S-target proteins are recruited to the ISC-machinery. This thesis focuses on the last step of Fe/S-cluster biogenesis; the incorporation of the Fe/S-cluster into target proteins. The goal of the first project was to analyze the status of the cysteine ligands of apo-Fe/S-proteins prior to the insertion of an Fe/S-cluster. Because the thiol-groups of these cysteines are exposed to the mitochondrial matrix, it seemed likely that the cell would manage to protect them against oxidative damage. Mass spectrometrical analysis of a mitochondrial Fe/S-protein revealed multiple increments in mass of +30 to +32 Da on Fe/S-proteins in cells with defects in the ISC-machinery. These modifications are most likely bridging polysulfides between the cysteine ligands of apo-Fe/S-proteins. Furthermore, these modifications were also found to a lesser degree in wildtype cells grown under standard conditions, and to a higher degree in cells which were cultured in iron poor medium. As the cysteine modifications could also be reductively cleaved, we suggest that the modification of the cysteine ligands of apo-Fe/S-proteins, with a per- or polysulfide, is actually a physiological protection mechanism against oxidation dependent protein degradation.

In the second project, a protein-fragment complementation assay was established in mitochondria of *S. cerevisiae* in order to characterize interactions between the late acting ISC-components Isa1, Isa2 and Iba57. The data of this *Renilla* split-luciferase assay indicates a trimeric complex of these three proteins *in vivo*. The assembly of this complex seems to be dependent of a functional active ISC-machinery. Furthermore, Isa1 and Isa2 were found to interact with Grx5, the first ISC-component, which receives the *de novo* assembled [2Fe-2S]-cluster from Isu1 and transfers it to [2Fe-2S]-target proteins. The interaction with Isa1 and Isa2 suggests that Grx5 can also donate its Fe/S-cluster to the late acting ISC-components for conversion into a [4Fe-4S]-cluster. The *Renilla* Split-Luciferase assay revealed interactions between Yah1 and Isa1, Isa2 and Iba57. This data proposes that the process of Fe/S-cluster conversion depends on the supply with reducing equivalents. Because the *Renilla* Split-Luciferase assay displayed a concentration dependent assembly of the two Luciferase domains in mitochondria, the interactions described here have to be verified with an independent method.

Einleitung

Klassifizierung von Fe/S-Cluster-Kofaktoren

Viele Proteine koordinieren ein anorganisches oder organisches Molekül als Kofaktor, welcher ihnen als strukturelle Stütze, als Katalysator oder als Energielieferant dient. Die Natur dieser Moleküle ist äußerst divers und reicht von der Bindung einfacher Metallionen wie Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , etc. über organische Kofaktoren wie Nukleosidtriphosphate oder Fettsäuren bis hin zu komplex aufgebauten prosthetischen Gruppen wie z.B. Vitamine, Häm oder Chlorophyll. Grundsätzlich betreiben Zellen aller *Regna* der Lebewesen verschiedenste Maschinerien, um eine korrekte Insertion und Biosynthese derartiger Kofaktoren voranzutreiben. Die Art der verwendeten Kofaktoren sowie deren Koordination in hoch spezialisierten Bindedomänen sind zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert. So lassen sich Proteine über ihre klassischen Faltungsmotive in verschiedene Familien einteilen (Lill, 2009).

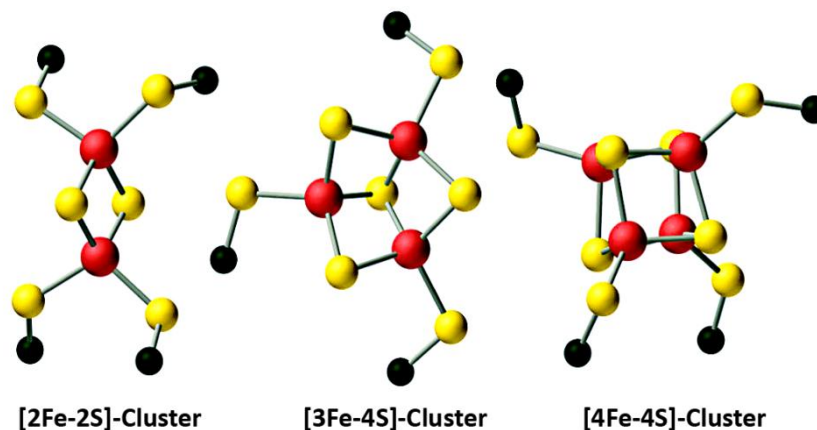


Abbildung E1 Klassen von Fe/S-Clustern. Die häufigsten biologischen Bauformen sind der rhombische [2Fe-2S]-Cluster sowie der kubische [4Fe-4S]-Cluster. Zusätzlich ist eine alternative Bauform, der [3Fe-4S]-Cluster, aufgeführt (Abbildung verändert nach (Averill & Eldredge, 2012)).

Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) zählen mit zu den ältesten und hoch konserviertesten Kofaktoren. Grundsätzlich treten sie biologisch hauptsächlich in zwei Ausprägungen auf. *In vivo* findet man vor allem einen rhombischen [2Fe-2S]-Cluster sowie einen kubischen [4Fe-4S]-Cluster (Abb. E1). Es wurden jedoch auch [3Fe-4S]-Kofaktoren oder komplexer zusammengesetzte Fe/S-Cluster beobachtet, teils als Mischform mit integrierten Fremdmetallen wie z.B. Molybdän in MoFe-Clustern in Nitrogenasen (Chan et al, 1993). Es zeigte sich jedoch, dass sich selbst diese komplexen Strukturen letztendlich auf die kubische und rhombische Grundform als Bausteine reduzieren lassen (Rees, 2002). Die Koordination von Fe/S-Clustern erfolgt meistens über vier Cysteinliganden. Hierbei liegen die Cysteinseitenketten als Thiolat vor und koordinieren die Eisenatome des Kofaktors. Diese Eisenatome können wiederum die Oxidationszustände Fe^{2+} und Fe^{3+} einnehmen (Cammack & Balk,

2014). Innerhalb des Fe/S-Kofaktors sind die Elektronen sowohl über Eisen als auch das verbrückte Sulfid delokalisiert (Johnson et al, 2005). Bis heute sind nur für wenige Klassen von Fe/S-Proteinen Konsensussequenzen für die Bindung eines Fe/S-Clusters bekannt. In der Regel ist die Vorhersage der Lage und der Bindung eines Fe/S-Clusters auf Grundlage der Aminosäuresequenz des Proteins nicht möglich und muss experimentell ermittelt werden (Lill, 2009). Zudem sind alternative Fe/S-Cluster-Liganden bekannt; so koordiniert zum Beispiel das Rieske-Protein (Rip1), ein Bestandteil von Komplex III der Atmungskette, seinen [2Fe-2S]-Cluster über zwei Cysteine und zwei Histidine (Beckmann et al, 1987; Solmaz & Hunte, 2008). Als weitere Fe/S-Cluster Liganden konnten in anderen Fe/S-Proteinen die Aminosäuren Asparat, Arginin oder Serin identifiziert werden (Lill, 2009).

Lokalisation und Aufgaben von Fe/S-Clustern

Fe/S-Proteine finden sich in Eukaryoten in verschiedenen Zellkompartimenten (siehe Abbildung E2), wo sie an vielen grundlegenden biologischen Prozessen beteiligt sind (Beinert et al, 1997; Lill & Muhlenhoff, 2008; Xu & Moller, 2011).

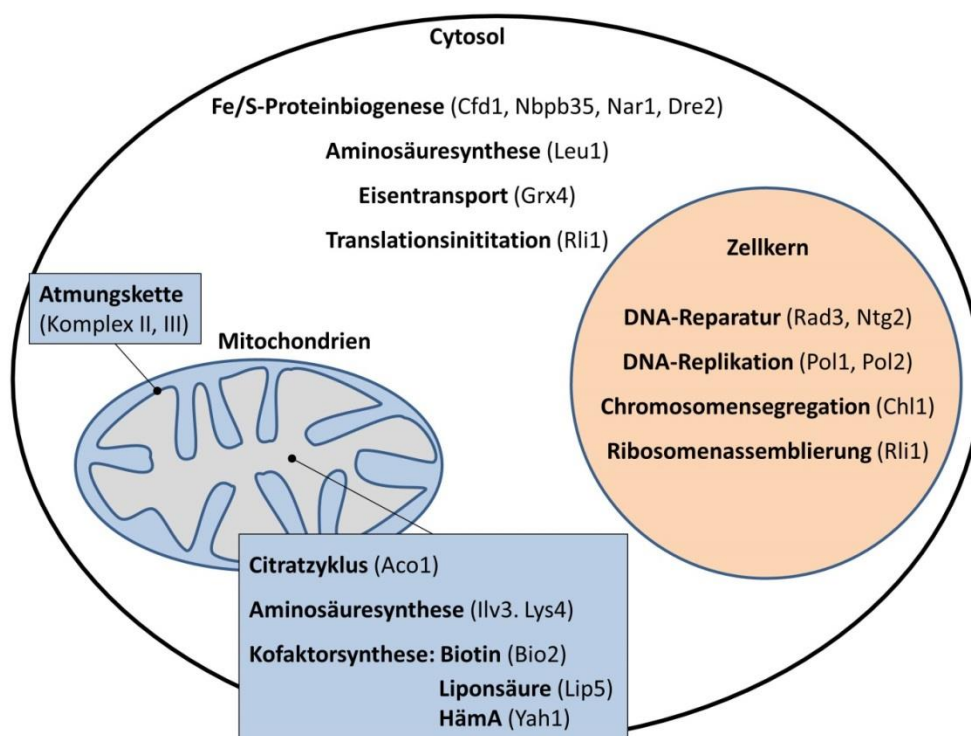


Abbildung E2 Subzelluläre Lokalisation und Funktionen von Fe/S-Proteinen in der eukaryotischen Zelle. Gezeigt sind Beispiele von Fe/S-Proteinen aus *S. cerevisiae* mit ihrer subzellulären Lokalisation und der Stoffwechselaktivität, an der sie beteiligt ist (Abbildung zusammengestellt nach (Lill, 2009)).

Mitochondrien sind auf die Nutzung von Fe/S-Proteinen in ihrer physiologischen Stoffwechselfunktion angewiesen. Komplex I der Atmungskette enthält z. B. gleich mehrere Fe/S-Cluster und ein Flavinmononukleotid. Letzteres akzeptiert die Elektronen von reduziertem $\text{NADH} + \text{H}^+$ und leitet sie über acht Fe/S-Cluster zu Coenzym Q weiter. Während der Weiterleitung der Elektronen können die Eisenionen des Fe/S-Clusters den Oxidationszustand Fe^{2+} und Fe^{3+} einnehmen (Beinert et al, 1997). Komplex II übernimmt die Elektronen des reduzierten Coenzym FADH_2 , auch hier ist der erste Akzeptor der Elektronen ein Fe/S-Zentrum. Komplex III enthält ebenfalls ein Fe/S-Protein, das bereits erwähnte Rieske-Fe/S-Protein (Beckmann et al, 1987; Stryer, 2010). Die angeführten Beispiele veranschaulichen, dass Fe/S-Proteine durch ihre exzellenten Redox Eigenschaften in vielen verschiedenen Stoffwechselwegen eine entscheidende Stellung als Akzeptoren und Donoren von Elektronen aus reduzierten Stoffwechseläquivalenten einnehmen (siehe auch HiPIP, Kapitel 1.2).

Eine weitere grundlegende Funktionsweise von Fe/S-Clustern als regulatorische und sensorische Komponente wird von der cytosolischen Aconitase in Vertebraten veranschaulicht. Ähnlich zur mitochondrialen Aconitase des Citratzyklus bindet dieses Protein einen [4Fe-4S]-Cluster und kann Citrat zu Isocitrat umwandeln. Die cytosolische Isoform dieses Enzyms wird zusätzlich als Eisensensor genutzt und reguliert die Umstellung von einem eisenspeichernden auf einen eisenakkumulierenden Stoffwechsel in der Zelle (Walden et al, 2006; Wallander et al, 2006).

Die strukturgebende Funktion des Fe/S-Clusters wird unter anderem auch offensichtlich in verschiedenen DNA-abhängigen DNA-Polymerasen (z.B. Pol1, Pol2) sowie ATP-abhängigen DNA-Helikasen (z.B. Rad3, Dna2) und der Primase Pri2 in Hefe (Klinge et al, 2007; Netz et al, 2012b; Pugh et al, 2008). Zudem veranschaulichen die gegebenen Beispiele die kritische Stellung von Fe/S-Proteinen im Nukleus der Zelle, wo sie am DNA-Metabolismus und am Erhalt der Genom-Stabilität beteiligt sind.

Neben den beschriebenen Funktionen können Fe/S-Cluster auch als Substrat in einer enzymatischen Katalyse beteiligt sein. So konnte zum Beispiel im Fall der Liponsäurebildung durch die Liponsäure Synthase Lip5 in der mitochondrialen Matrix eine direkte Übertragung eines Schwefels des Fe/S-Kofaktors auf das Akzeptormolekül gezeigt werden. Ähnliches gilt für die Biotinsynthese durch die Biotin Synthase, Bio2 (Cicchillo & Booker, 2005). Die oben bereits erwähnte mitochondriale Aconitase katalysiert die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat unter Abspaltung und Addition von Wasser, wobei ein Eisenatom ihres [4Fe-4S]-Clusters hierbei als Lewis-Säure fungiert (Emptage et al, 1983). Alles in allem sind die Aufgaben und die Lokalisationen von Fe/S-Proteinen äußerst divers.

Welche Systeme von Fe/S-Cluster assemblierenden Maschinerien gibt es?

Da sich Apo-Fe/S-Proteine *in vitro* mit einem Fe/S-Cluster rekonstituieren lassen, nahm man zunächst an, dass sich Fe/S-Cluster *in vivo* ebenfalls spontan auf den entsprechenden Zielproteinen assemblierten. Tatsächlich entdeckte man jedoch, dass für die *de novo* Biogenese und die Insertion von Fe/S-Clustern komplizierte Proteinmaschinerien in den Zellen benötigt werden. Diese Proteinfabriken folgen einem analogen, grundsätzlich aber sehr ähnlichen Funktions- und Aufbauprinzip. In zwei Stufen wird zunächst ein Fe/S-Cluster auf einem Gerüstprotein assembliert und in der Folge auf Fe/S-Zielproteine übertragen (Abb. E3). Für den ersten Schritt, die *de novo* Assemblierung eines Fe/S-Clusters auf einem Gerüstprotein, werden Sulfid und Eisen, welches biologisch in der Ferro- (Fe^{2+}) und in der in Wasser unlöslichen Ferri-Form (Fe^{3+}) vorkommt, benötigt. Eine Desulfurase konvertiert L-Cystein zu L-Alanin und stellt den Schwefel in Form eines Cystein-gebundenen Persulfids bereit. Da der Schwefel in L-Cystein im Redoxzustand S^0 und nicht wie im Fe/S-Cluster im Redoxzustand S^{2-} vorliegt, werden zudem Reduktionsäquivalente benötigt. (Johnson et al, 2005; Lill, 2009). Der auf dem Gerüstprotein assemblierte Fe/S-Cluster wird im zweiten Schritt auf verschiedene Akzeptorproteine transferiert und inseriert.

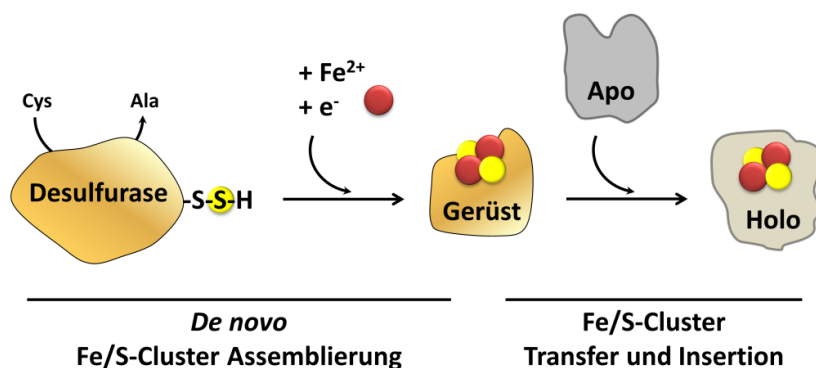


Abbildung E3 Allgemeines funktionelles Prinzip der Synthese von Fe/S-Clustern *in vivo*. Im ersten Schritt erfolgt die *de novo* Biogenese eines Fe/S-Clusters auf einem Gerüstprotein. Für diesen Prozess wird Persulfid-gebundener Schwefel von einer Desulfurase bereitgestellt, welche hierfür L-Cystein zu L-Alanin konvertiert. Dieser Prozess erfordert zusätzlich noch Reduktionsäquivalente. Eisen wird wahrscheinlich in der biologisch verfügbaren Ferro-Form (Fe^{2+}) bereitgestellt. In einer zweiten Teilreaktion wird der auf dem Gerüstprotein assemblierte Fe/S-Cluster mit Hilfe weiterer Assemblierungsfaktoren auf Apo-Fe/S-Zielproteine übertragen (Abbildung erstellt nach (Lill, 2009)).

Die zuerst identifizierte Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie ist das NIF-System (nitrogen fixation) aus stickstofffixierenden Bakterien, welches für die spezifische Reifung ihres Nitrogenasekomplexes verantwortlich ist (Dean et al, 1993). Dieser Komplex dient wiederum der Reduktion atmosphärischen Stickstoffs. Die Cystein Desulfurase NifS wandelt mit Hilfe eines Pyridoxalphosphat-Kofaktors die Aminosäure L-Cystein zu L-Alanin um und generiert hierbei ein NifS-gebundenes Persulfid für die Bildung eines Fe/S-Clusters (Layer et al, 2007; Zheng & Dean, 1994). Die

Deletion dieser Desulfurase in *A. vinelandii* war jedoch nicht letal, was vermuten ließ, dass es mindestens eine weitere redundante Maschinerie geben sollte. Tatsächlich wurden in der Folge zwei weitere Fe/S-Cluster Biogenese Maschinerien in Bakterien entdeckt und weitergehend charakterisiert: die ISC- (iron sulfur cluster) Maschinerie und das SUF- (sulfur mobilization) System (Ayala-Castro et al, 2008; Py & Barras, 2010; Roche et al, 2013). Es gibt viele Bakterien, welche sowohl das ISC- als auch das SUF-Operon besitzen und diese je nach Umweltbedingung einzeln an- und abschalten können. In *E. coli* wird das SUF-System vor allem unter Eisenmangel oder oxidativem Stress aktiv (Boyd et al, 2014).

Auch in Eukaryoten wurden in der Folge homologe Maschinerie-Proteine entdeckt. So fand man in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* ebenfalls eine ISC-Assemblierungsmaschinerie (Craig & Marszalek, 2002; Schilke et al, 1999; Strain et al, 1998) sowie ein SUF-System in den Plastiden von Pflanzen (Pilon et al, 2006; Xu & Moller, 2011). Die Anwesenheit beider Systeme in Eukaryoten lässt sich mit der Endosymbiontentheorie erklären (Hjorth et al, 2005). Neben den beiden bakteriellen Maschinerien entwickelten Eukaryoten noch eine eigenständige CIA-Maschinerie (cytosolic iron-sulfur-protein assembly) für die spezifische Maturierung cytosolischer Fe/S-Zielproteine (Paul & Lill, 2014; Paul & Lill, 2015; Sharma et al, 2010). Diese ist jedoch direkt abhängig von einer funktionierenden ISC-Maschinerie und mit ihr über ein ISC-Export-System gekoppelt (Kispal et al, 1999; Lill et al, 2012; Paul & Lill, 2014). In den folgenden zwei Kapiteln werden die Funktionsweisen der eukaryotischen ISC- und CIA-Maschinerie eingehender erläutert.

Die mitochondriale ISC-Maschinerie im Modellorganismus *S. cerevisiae*

In Eukaryoten ist die mitochondriale ISC- (iron sulfur cluster) Maschinerie stark konserviert. Im Folgenden wird die Hefe Nomenklatur vorgestellt, da alle Arbeiten der vorliegenden Dissertation im Modellorganismus *S. cerevisiae* ausgeführt wurden.

Die *de novo* Synthese von Fe/S-Clustern erfolgt in *S. cerevisiae* auf dem Gerüstprotein Isu1. Dieses hat ein Paralog in der Bäckerhefe, nämlich Isu2. Isu2 kann für die genomische Deletion von Isu1 kompensieren; normalerweise ist Isu1 jedoch die vorherrschend genutzte Form (Garland et al, 1999). Für die Synthese eines Fe/S-Clusters wird zunächst Eisen in der biologisch zugänglichen Ferro-Form (Fe^{2+}) benötigt, welches hauptsächlich mit Hilfe der mitochondrialen Carrierproteine Mrs3/4 (Mitoferrin in Vertebraten) importiert wird (Froschauer et al, 2009; Lill et al, 2012). Der zweite wichtige Grundbaustein für die *de novo* Fe/S-Cluster-Biogenese wird durch die Desulfurase Nfs1 im Komplex mit Isd11 bereitgestellt (Adam et al, 2006; Kispal et al, 1999; Muhlenhoff et al, 2004; Wiedemann et al, 2006).

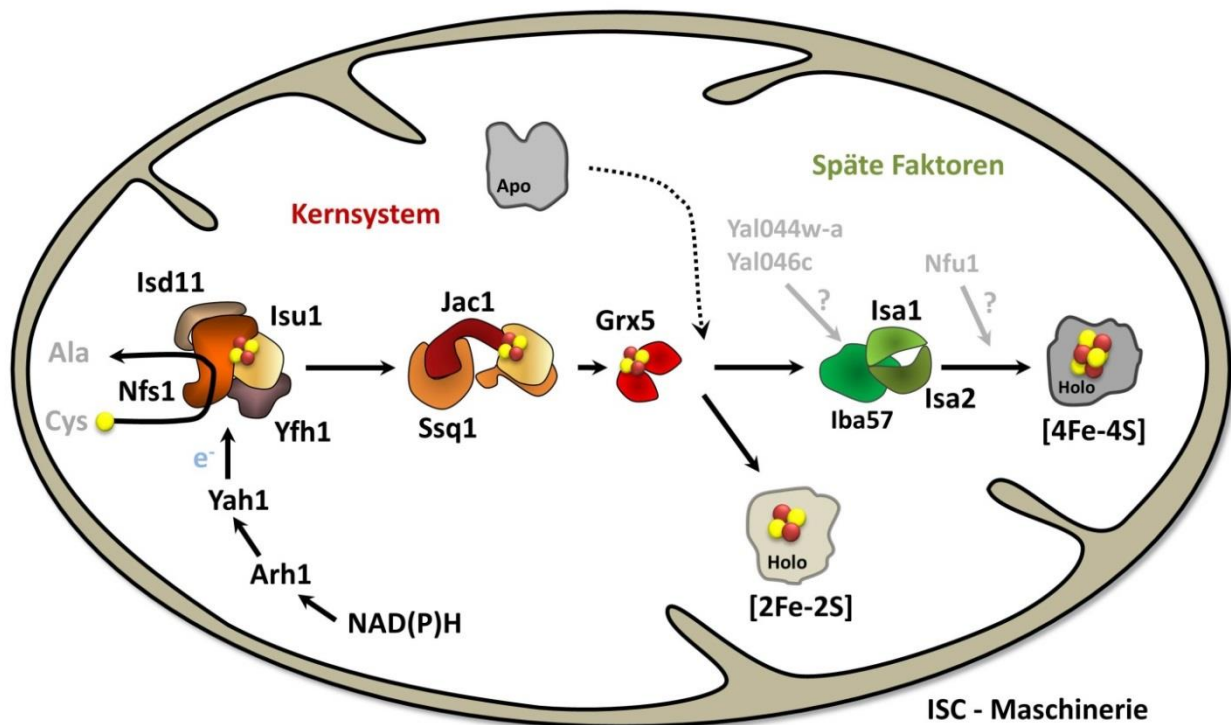


Abbildung E4 Vereinfachtes Modell für die *de novo* Biogenese von Fe/S-Proteinen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae*. Mitochondrien importieren zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) in einem Membranpotential abhängigen Prozess aus dem Cytosol mit Hilfe der mitochondrialen Carrierproteine Mrs3/4. Die *de novo*-Biogenese mitochondrialer Fe/S-Cluster beginnt in Form eines [2Fe-2S]-Clusters auf dem Gerüstprotein Isu1. An diesem katalytischen Prozess sind der Desulfurasekomplex Nfs1-Isd11 sowie Yfh1 und die Elektronentransportkette von NADH über Arh1 zu Yah1 essentiell beteiligt. In einem zweiten Schritt wird der Fe/S-Cluster von Isu1 mit Hilfe eines Chaperonsystems, bestehend aus dem Hsp70-Typ Chaperon Ssq1, seinem Kochaperon Jac1 und dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 auf das Monothiol Glutaredoxin Grx5 übertragen. Grx5 kann den [2Fe-2S]-Cluster entweder direkt an Apo-[2Fe-2S]-Zielproteine übertragen oder diesen der späten ISC-Maschinerie für die Konversion in einen [4Fe-4S]-Cluster bereitstellen. Für den letztgenannten Schritt werden mindestens die drei späten ISC-Faktoren Isa1, Isa2 und Iba57 benötigt, eine zusätzliche funktionelle Beteiligung der BOLA-ähnlichen Proteine Yal044w-a (Bol1) und Yal046c (Bol3) wird derzeit untersucht. Nfu1 ist ein spezialisierter Assemblierungsfaktor für die Maturierung einzelner Fe/S-Zielproteine, seine genaue Funktion bleibt jedoch zu ermitteln.

Nfs1 konvertiert L-Cystein zu L-Alanin, wobei Nfs1 das dabei frei werdende Schwefelatom zunächst kovalent in Form eines Persulfids auf einem katalytischen Cystein bindet. Der terminale Schwefel wird anschließend auf eine Cysteinseitenkette von Isu1 (vermutlich Cystein C104) übertragen, auf dem die *de novo* Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters beginnt (Parent et al, 2015; Smith et al, 2001). Die genannten Proteine bilden hierbei zusammen mit Frataxin (Yfh1) einen Superkomplex (Kim et al, 2014; Parent et al, 2015; Prischi et al, 2010). Yfh1 (yeast frataxin homologue) wirkt als wichtiger allosterischer Aktivator der Aktivität des ISC-Kernkomplexes (Fox et al, 2015; Parent et al, 2015; Tsai & Barondeau, 2010; Webert et al, 2014), seine genaue Funktion ist nach wie vor jedoch nicht vollständig entschlüsselt. Da der Schwefel im Cystein im Redoxzustand S^0 und nicht wie im

Fe/S-Cluster im Redoxzustand S^{2-} vorliegt, erfordert der Prozess der Fe/S-Cluster-Biogenese zusätzlich noch Reduktionsäquivalente. Die Elektronen werden in *S. cerevisiae* von einer Redoxkette an Proteinen bereitgestellt. Elektronen werden von $NADH+H^+$ auf die Adrenodoxin-abhängige Reduktase Arh1 übertragen, welche sie wiederum an ein [2Fe-2S]-Ferredoxin (Yah1) weiterleitet. Yah1 stellt die Elektronen letztlich für die Fe/S-Cluster-Synthese auf Isu1 bereit (Muhlenhoff et al, 2003).

Der [2Fe-2S]-Cluster auf Isu1 wird im Folgenden mit Hilfe eines Chaperonsystems, bestehend aus dem Hsp70-Typ Chaperon Ssq1 und seinem Kochaperon Jac1, von Isu1 abgelöst und auf ein Glutaredoxin übertragen. Apo-Isu1 besitzt eine hohe Affinität gegenüber den Komponenten des beschriebenen Kern-ISC-Komplexes. Sobald Isu1 in seine Holo-Form überführt wird, verändert sich seine Affinität und es bindet präferentiell an Jac1, welches wiederum Isu1 an das Chaperon Ssq1 rekrutiert. Die Bindestellen von Isu1 an Jac1 und Nfs1 sowie von Isu1 an Yfh1 und Ssq1 sind hierbei identisch (Manicki et al, 2014). Unter ATP-Hydrolyse verändert Ssq1 seine Konformation und Jac1 dissoziiert ab. Eine weitere Konformationsänderung des Chaperons durch Austausch seines dephosphorylierten Kofaktors gegen ATP mit Hilfe des Nukleotid Austauschfaktors Mge1 überträgt den [2Fe-2S]-Cluster auf das Glutaredoxin Grx5, wobei Apo-Isu1 abdissoziiert (Kampinga & Craig, 2010; Lill et al, 2012). Die Verwendung von Ssq1 innerhalb der ISC-Maschinerie stellt einen Spezialfall der Hefe dar. In anderen Eukaryoten übernimmt diese Funktion das mitochondriale Hsp70.

Grx5 bindet den [2Fe-2S]-Cluster als Heterodimer über jeweils einen Cysteinrest und zwei Grx5-gebundene Glutathionmoleküle (Johansson et al, 2010). Dieser Fe/S-Cluster kann von Grx5 ohne weitere Assemblierungsfaktoren auf [2Fe-2S]-Zielproteine transferiert werden (Uzarska et al, 2013). Für die Maturation von [4Fe-4S]-Proteinen werden zusätzlich die späten ISC-Komponenten benötigt, wobei die Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 für diesen Prozess essentiell sind (Gelling et al, 2008; Muhlenhoff et al, 2007; Muhlenhoff et al, 2011). Diese drei Proteine interagieren miteinander und konvertieren den [2Fe-2S]-Cluster von Grx5 in einem bisher ungeklärten Mechanismus zu einem [4Fe-4S]-Cluster, der dann entweder direkt oder durch weitere Hilfsproteine auf Fe/S-Zielproteine übertragen wird (Banci et al, 2014). Ind1 ist ein Beispiel für ein derartiges Hilfsprotein. Es wird für die Insertion mehrerer [4Fe-4S]-Cluster in Komplex I benötigt (Sheftel et al, 2009).

Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, ob es im Zusammenspiel mit der späten ISC-Maschinerie eventuell weitere Komponenten gibt (Lill et al, 2012). So ist z.B. die Rolle der beiden mitochondrialen BolA-ähnlichen Proteine der Hefe, nämlich Yal044w-a (humanes BolA1) und Yal046c (humanes BolA3), nicht genau geklärt. Fra2 (humanes BolA2) wird im Cytosol exprimiert und ist an der Messung des Eisengehaltes und der Aktivierung des Eisenregulons der Hefe unter Eisenmangelbedingungen verantwortlich (Kumanovics et al, 2008). BolA1 bildet *in vivo* einen heterodimeren Komplex mit Grx5 und bindet *in vitro* einen gebrückten Fe/S-Cluster (Willems et al, 2013). Derzeit wird eine Funktion

von Yal046w-a (Bol1) als Rekrutierungsfaktor für Holo-Grx5 an die Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 vermutet (Winge, Mühlhoff, Uzarska, nicht veröffentlichte Daten). Bei Zwillingen konnte eine homozygote „Missense“-Mutation in humanem BOLA3 nachgewiesen werden. Beide Säuglinge starben innerhalb des ersten Lebensmonats und wiesen eine Defizienz der Atmungskettenkomplexe I, II und III, zusammen mit einem Defekt der Pyruvatdehydrogenase auf (Haack et al, 2013). Eine weitere Studie lieferte einen Zusammenhang zwischen Mutationen in den beiden Genen NFU1 und BOLA3 und Defekten in den Komplexen I - III und der Liponsäuresynthese (Cameron et al, 2011; Navarro-Sastre et al, 2011). Alles in allem legen diese Daten eine Aufgabe von Yal046c (Bol3) innerhalb der ISC-Maschinerie nahe, seine genaue Funktion, seine Interaktionspartner und der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus sind jedoch noch nicht entschlüsselt.

Nfu1 sowie das bakterielle Homolog NfuA binden einen Fe/S-Cluster *in vitro* und *in vivo* (Angelini et al, 2008; Bandyopadhyay et al, 2008; Py et al, 2012; Schilke et al, 1999). Im Menschen wurde auf Grund erhöhter Glycinkonzentrationen in Plasma, Urin und der Cerebrospinalflüssigkeit der betroffenen Patienten ein funktioneller Zusammenhang zwischen Mutationen im *NFU1*-Gen und dem Auftreten von Leukoencephalopathie und schwerer pulmonaler Hypertension vermutet. Die Aktivität von Komplex II und Komplex IV waren in den Patienten stark reduziert (Tonduti et al, 2015). Vieles deutet somit auf eine Funktion von Nfu1 innerhalb der späten ISC-Maschinerie als ein spezialisierter Assemblierungsfaktor für die Maturierung einzelner Zielproteine hin (Navarro-Sastre et al, 2011).

Die cytosolische CIA-Maschinerie und die Rolle von Atm1 in der ISC-Export-Maschinerie

In Eukaryoten hat sich eine weitere Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie im Cytosol entwickelt. Dieses CIA- (cytosolic iron-sulfur-protein assembly) System steht über den ABC-Transporter Atm1 in funktionellem Kontakt mit der mitochondrialen ISC-Maschinerie. Hierbei wird eine schwefelhaltige Komponente X aus den Mitochondrien exportiert. Die chemische Natur von X ist bisher unklar, jedoch spielt Glutathion im Export eine entscheidende Rolle (Sipos et al, 2002). Atm1 wurde kürzlich zudem mit einem gebundenen Glutathionmolekül kristallisiert, was ebenfalls den Schluss nahelegt, dass Atm1 ein Glutathion-Derivat transportiert (Srinivasan et al, 2014). *In vitro* bildet Glutathion mit Eisen und Sulfid in wässriger Lösung einen stabilen [2Fe-2S]-Cluster (Qi et al, 2012). Ob Atm1 diese Struktur oder alternativ z.B. Glutathionpolysulfide transportiert, ist unklar (Li & Cowan, 2015; Qi et al, 2014; Schaedler et al, 2014; Srinivasan et al, 2014). Siehe hierzu auch (Lill et al, 2015; Lill et al, 2014).

Die Komponente X wird vom CIA-System für die Maturierung cytosolischer Fe/S-Proteine genutzt (Kispal et al, 1999; Pondarre et al, 2006). Damit ist es direkt abhängig von einer funktionierenden ISC-Maschinerie. Im CIA-System wird zunächst ein Fe/S-Cluster auf einem Gerüstprotein-Komplex, bestehend aus den P-Loop NTPasen Cfd1 und Nbp35, transient gebunden und anschließend auf

Fe/S-Zielproteine übertragen (Abb. E5). Die CIA-Maschinerie folgt somit dem Funktionsprinzip aller bisher entdeckten Fe/S-Assemblierungsmaschinerien (Paul & Lill, 2014). Der tetramere Cfd1-Nbp35-Komplex bindet vier [4Fe-4S]-Cluster, wobei zwei dieser Fe/S-Cluster an den N-terminus von Nbp35 gebunden vorliegen und zwei weitere an der Interaktionsfläche von jeweils einem Nbp35- und einem Cfd1-Protein koordiniert werden (Netz et al, 2012a). Letztere Fe/S-Cluster sind labil und lassen sich innerhalb der CIA-Maschinerie übertragen (Hausmann et al, 2005; Netz et al, 2007; Pallesen et al, 2013).

An der Fe/S-Cluster-Assemblierung auf Nbp35 und Cfd1 sind weiterhin die Diflavinreduktase Tah18 und das Fe/S-Protein Dre2 essentiell beteiligt. Diese bilden eine Elektronentransportkette, bei der Dre2 Elektronen von Tah18 erhält, welches wiederum von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ reduziert wird (Netz et al, 2010). Anschließend wird der Fe/S-Cluster von Nbp35/Cfd1 mit Hilfe des Hydrogenase ähnlichen Proteins Nar1 auf cytosolische Apo-Fe/S-Proteine übertragen (Balk et al, 2004), wobei der Kontakt zu den Zielproteinen durch den sogenannten „CIA-targeting complex“ vermittelt wird. Dieser besteht aus dem β -Propeller Protein Cia1, welches vermutlich eine Plattform für die Bindung der späten CIA-Komponenten bildet (Srinivasan et al, 2007). Außerdem beinhaltet der Komplex das Protein Cia2, einen Reifungsfaktor für Fe/S-Zielproteine (Stehling et al, 2013), und das HEAT-Repeat Protein Mms19 (Met18) (Balk et al, 2005; Paul & Lill, 2014). Mms19 hat eine direkte Rolle beim Transfer von Fe/S-Clustern auf unterschiedliche Apo-Proteine, nämlich Fe/S-Proteine des Methionin Biosynthese Stoffwechselweges, der DNA-Replikation und -Reparatur und der Telomerstabilisierung (Stehling et al, 2012).

Die CIA-Maschinerie ist in Eukaryoten stark konserviert (Sharma et al, 2010). In humanen Zellen werden anders als in Hefezellen unterschiedliche Zielproteine von verschiedenen Teilkomplexen des „CIA-targeting complex“ maturiert, wobei z.B. humanes Cia1 mit Cia2A oder Cia2B wahlweise einen Komplex eingehen und damit durchaus an der Maturierung verschiedener Zielproteine beteiligt sein kann (Stehling et al, 2013).

Zusätzlich hängt die extramitochondriale Fe/S-Cluster-Biogenese von den cytosolischen Monothiol-Glutaredoxinen Grx3 und Grx4 ab. Beide Proteine koordinieren als Heterodimer zusammen mit zwei Glutathionmolekülen einen [2Fe-2S]-Cluster. Neben ihrer Aufgabe im CIA-System fungiert dieser Holo-Grx3-Grx4-Komplex auch als Eisensensor und stellt für nahezu alle eisenabhängigen Syntheseapparate Eisen bereit, so z. B. auch für die Häm-Synthese. Auf Grund dieser generellen Funktion werden Grx3 und Grx4 nicht als CIA-Faktoren beschrieben (Haunhorst et al, 2013; Li et al, 2009; Muhlenhoff et al, 2010). Zudem ist die Assemblierung des [2Fe-2S]-Clusters auf Grx3, Grx4 unabhängig von der CIA-Maschinerie. Im Gegensatz zur ISC-Maschinerie hat das CIA-System daher

auch keinen Einfluss auf das Eisenregulon der Zelle (Hausmann et al, 2008; Kaplan & Kaplan, 2009; Lill & Muhlenhoff, 2008).

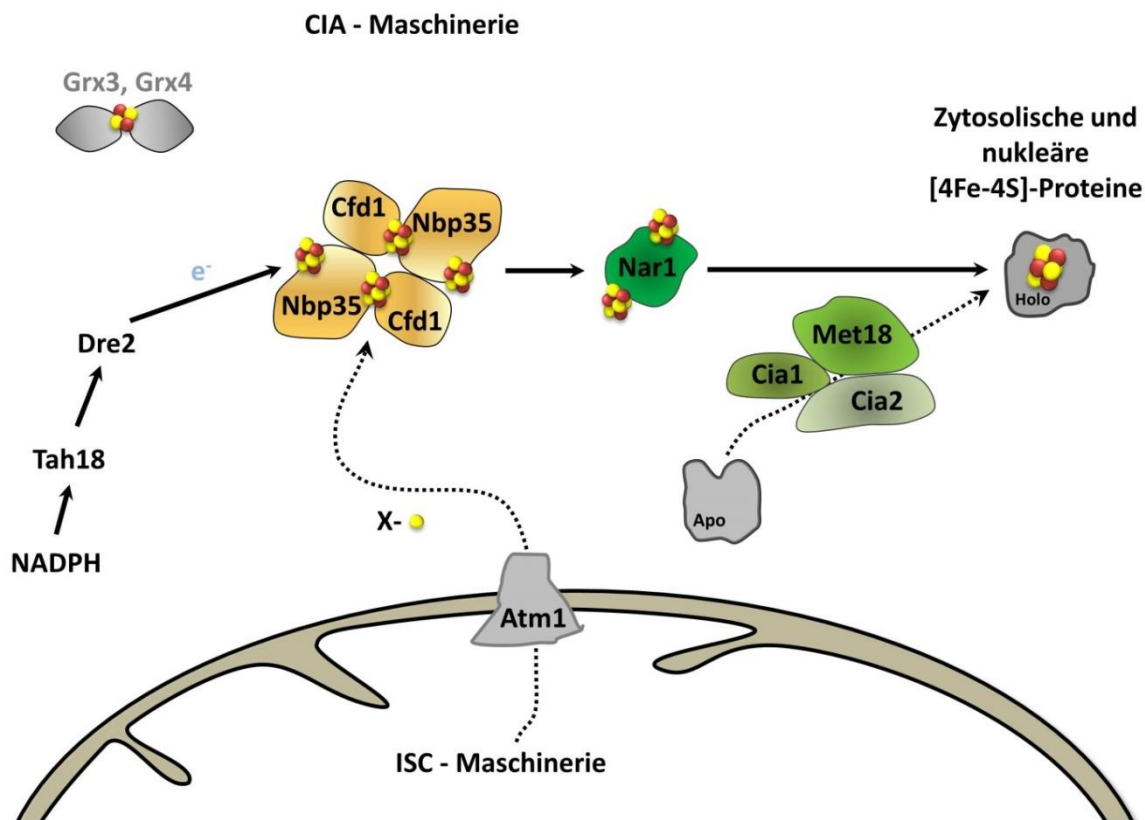


Abbildung E5 Vereinfachtes Modell der *de novo* Fe/S-Cluster-Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine durch die CIA-Maschinerie im Modellorganismus *S. cerevisiae*. Die *de novo* Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine kann in zwei Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird ein verbrückender [4Fe-4S]-Cluster auf dem heterotetrameren Gerüstproteinkomplex aus Cfd1 und Nbp35 assembliert. Atm1 exportiert hierbei eine schwefelhaltige Komponente (X) aus der mitochondrialen Matrix und stellt diese für die *de novo* Fe/S-Cluster-Biogenese im Cytosol bereit. Die für diese Reaktion benötigten Reduktionsäquivalente werden über eine Elektronentransportkette aus $\text{NADPH} + \text{H}^+$, Tah18 und Dre2 bereitgestellt. Im zweiten Schritt wird der verbrückende Fe/S-Cluster von dem Gerüstproteinkomplex auf Apo-Fe/S-Zielproteine übertragen. Dieser Schritt erfordert die Mithilfe weiterer CIA-Komponenten, wie dem Fe/S-Protein Nar1 und dem CIA-Targetingkomplex aus Cia1, Cia2 und Met18. Die Biogenese extramitochondrialer Fe/S-Zielproteine erfordert zudem die cytosolischen Monothiol-Glutaredoxine Grx3 und Grx4.

Zielsetzung der Arbeit

In Eukaryoten ist das ISC- (iron sulfur cluster) System für die Maturierung mitochondrialer Fe/S-Proteine verantwortlich. Zusätzlich ist es essentiell beteiligt an der Maturierung extramitochondrialer Proteine. Der Prozess der *de novo* Assemblierung eines Fe/S-Clusters auf dem Gerüstprotein Isu1 durch die ISC-Maschinerie ist funktionell in großen Teilen entschlüsselt. Wenig ist hingegen über die späten ISC-Faktoren Isa1, Isa2 und Iba57 sowie den durch diese Komponenten katalysierten Prozess der Fe/S-Cluster-Konversion bekannt. Die vorliegende Dissertation beschäftigt

sich mit zwei Teilaspekten aus dem letzten Schritt der Fe/S-Cluster-Biogenese, der Insertion des Fe/S-Clusters in Zielproteine. Die Rekrutierung von Fe/S-Zielproteinen an die Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinen ist bisher wenig untersucht. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde erstmalig der Oxidationsstatus der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Zielproteinen unmittelbar vor der Insertion des Fe/S-Clusters bestimmt (Christ, 2011). Es zeigte sich, dass mitochondriale [4Fe-4S]-Proteine eine Dynamik in der Zugänglichkeit ihrer Cysteinliganden in Zellen mit unterschiedlichen Defekten in der ISC-Maschinerie aufweisen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte nun erstmalig die Ursache für die Abschirmung der Cysteinliganden von mitochondrialen Apo-Fe/S-Proteinen herausgefunden werden. Da sich die abgeschirmten Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen *in vivo* durch vorherige Reduktion für eine Cystein-SH-Modifikation zugänglich machen lassen, wurde zu Beginn dieser Arbeit eine endogene chemische Modifikation auf den Fe/S-Cluster-Liganden vermutet. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte ein Fe/S-Protein in seiner Holo- und Apo-Form aus Wildtyphefen, bzw. Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie gereinigt werden. Die massenspektrometrische Bestimmung des Molekulargewichts der beiden Proben sollte im Folgenden Aufschluss über die Natur der Abschirmung der Cysteinliganden in Apo-Fe/S-Proteinen geben. Als erstes musste hier jedoch ein geeignetes Protokoll für die native Reinigung ausreichender Mengen an Protein aus den Mitochondrien von *S. cerevisiae* etabliert werden.

Im Rahmen des zweiten Teilprojektes wurde ein Protein-Fragment-Komplementationssystem auf der Basis eines *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems für die systematische Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* entwickelt. Mit Hilfe dieses Testsystems sollten Einblicke in das Zusammenspiel und die Dynamik des Isa1, Isa2, Iba57-Komplexes *in vivo* gewonnen werden. Zudem sollte es dazu genutzt werden, Aussagen über eine mögliche funktionelle Interaktion der ISC-Komponenten Nfu1, Yal044w-a (Bol1) und Yal046c (Bol3) mit der späten ISC-Maschinerie zu treffen. Bisher gibt es zudem keinerlei Daten bezüglich der Fragestellung, ob der Prozess der Fe/S-Cluster-Konversion auf die Versorgung mit Reduktionsäquivalenten angewiesen ist. Mit Hilfe des Split-Luciferase-Systems sollte daher die mögliche Interaktion des Isa1, Isa2, Iba57-Komplexes mit Yah1 untersucht werden. Die Entdeckung einer derartigen Interaktion würde einen neuen Einblick in den Reaktionsmechanismus der späten ISC-Maschinerie erlauben.

Ergebnisse

Defekte in der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Cluster Assemblierung induzieren eine Cystein S-Polythiolierung auf Fe/S-Zielproteinen

1.1 Defekte in der mitochondrialen ISC-Maschinerie führen zu spezifischen Veränderungen in der Zugänglichkeit der Cysteinseitenketten mitochondrialer Fe/S-Proteine

Defekte in der Maturierung mitochondrialer Fe/S-Proteine sind oft eng assoziiert mit erhöhten Leveln an oxidativem Stress (Belli et al, 2004; Pujol-Carrion et al, 2006; Strain et al, 1998). In einer Diplomarbeit wurde untersucht, welchen Einfluss eine defekte ISC-Maschinerie auf die Cysteinseitenketten des mitochondrialen Proteoms hat (Christ, 2011). Hierbei wurde die Thiol-reaktive Sonde 1,5-I-AEDANS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) dazu genutzt, isolierte Mitochondrien aus Wildtyphefezellen und aus Zellen, in denen einzelne ISC-Gene mit einem *Gal1-10*-Promotor zuvor depletiert worden waren, zu modifizieren. Diese Modifikation erlaubte Rückschlüsse auf den Oxidationsstatus der Cysteinseitenketten der mitochondrialen Proteine. Es ließen sich hierbei jedoch nur sehr geringe Unterschiede zwischen den untersuchten Hefestämmen beobachten, und zudem zeigten lediglich einzelne mitochondriale Proteine eine Dynamik in der Zugänglichkeit ihrer Cysteinseitenketten im AEDANS-Modifikationsmuster. Die erwartete verstärkte Oxidation mitochondrialer Cystein-SH-Gruppen in ISC-Mutanten konnte mit der gewählten Methode jedoch nicht beobachtet werden. Ein Protein offenbarte jedoch eine besonders starke Dynamik: Das mitochondriale [4Fe-4S]-Protein Aconitase zeigte für die AEDANS-Sonde stark zugängliche Cysteinseitenketten in ISA1 sowie IBA57 depletierten Zellen. In Zellen, in denen hingegen Kern-ISC-Komponenten depletiert worden waren, waren die Cysteinreste für eine Modifikation abgeschirmt (Christ, 2011).

Dass es sich bei dieser dynamischen Zugänglichkeit der Cysteinseitenketten um die Fe/S-Cluster-Liganden von Fe/S-Proteinen in ihrer Apo-Form handelte, wurde durch rekombinante Expression des kleinen [4Fe-4S]-Proteins HiPIP (High Potential Iron-Sulfur Protein) aus *Allochromatium vinosum* in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* gezeigt. Im Gegensatz zur Aconitase besitzt HiPIP lediglich vier Cysteine, welche alle als Fe/S-Cluster-Liganden genutzt werden. Die Cysteinseitenketten des Proteins ließen sich in Zellen, in denen späte ISC-Komponenten depletiert worden waren, mit der Cystein-SH-Sonde Maleimid-PEG₁₁-Biotin (MPB-11) modifizieren. In Zellen mit Defekten in der Kern-ISC-Maschinerie waren diese jedoch für eine Modifikation unzugänglich. Die einzige Abweichung in der Zugänglichkeit der Cysteinliganden von [4Fe-4S]-Proteinen wurde für die Kern-ISC-Komponente Grx5 beobachtet. In Zellen, in denen Grx5 depletiert wurde, waren die Cysteinliganden von Apo-[4Fe-4S]-Proteinen ebenfalls frei zugänglich, die von Apo-[2Fe-2S]-Proteinen jedoch unzugänglich. Zusätzlich

konnte gezeigt werden, dass die Cysteinliganden mitochondrialer [2Fe-2S]- sowie Rieske-Typ-Fe/S-Proteine in Zellen mit Defekten in der mitochondrialen ISC-Maschinerie bis zur Insertion ihres Fe/S-Clusters abgeschirmt werden (Christ, 2011). Offensichtlich gibt es einen Zusammenhang zwischen den chronologischen Abfertigungsschritten bei der *de novo* Fe/S-Cluster-Biogenese und der Zugänglichkeit der Cysteinliganden der Apo-Fe/S-Zielproteine (Christ, 2011).

Grundsätzlich konnten die Cysteinliganden mitochondrialer Apo-Fe/S-Proteine in Zellen mit Defekten der Kern-ISC-Maschinerie jedoch durch vorherige Reduktion für eine Modifikation mit MPB-11 zugänglich gemacht werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Cysteinseitenketten von Apo-Fe/S-Proteinen durch eine reversible chemische Modifikation geschützt werden könnten. Die Natur dieser Modifikation sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation aufgeklärt werden. Hierzu wurde das bakterielle [4Fe-4S]-Protein HiPIP aus den Mitochondrien von Wildtyp *S. cerevisiae* Zellen und Zellen mit Defekten in der Kern-ISC-Maschinerie nativ gereinigt. Im Anschluss sollte mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden die Natur der chemischen Modifikation auf den Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen identifiziert werden.

1.2 Reinigung des bakteriellen [4Fe-4S]-Proteins HiPIP aus den Mitochondrien von *S. cerevisiae*

Viele Wissenschaftler, die nicht direkt mit *S. cerevisiae* arbeiten, sehen auch in der Regel die Bäckerhefe als einen guten Organismus für die generelle Überexpression und Reinigung von Proteinen an. Tatsächlich lässt sie sich für diesen Zweck jedoch nur sehr begrenzt verwenden, da eine starke Überexpression von Proteinen wie in *E. coli* in der Regel nicht möglich ist. Daher fällt die Proteinausbeute nach einer Reinigung deutlich geringer aus. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Grund für die Unzugänglichkeit der Cysteinliganden mitochondrialer Apo-Fe/S-Proteine massenspektrometrisch durch direkten Vergleich der Molekulargewichte der Apo- und Holo-Form eines Fe/S-Proteins zu identifizieren. Für dieses Vorgehen wurde ein kleines Fe/S-Protein gesucht, welches sich gut in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* überexprimieren und auf Grund seiner physikochemischen Eigenschaften von diesen nativ separieren ließ. Die Wahl fiel auf das [4Fe-4S]-Protein HiPIP aus *A. vinosum*.

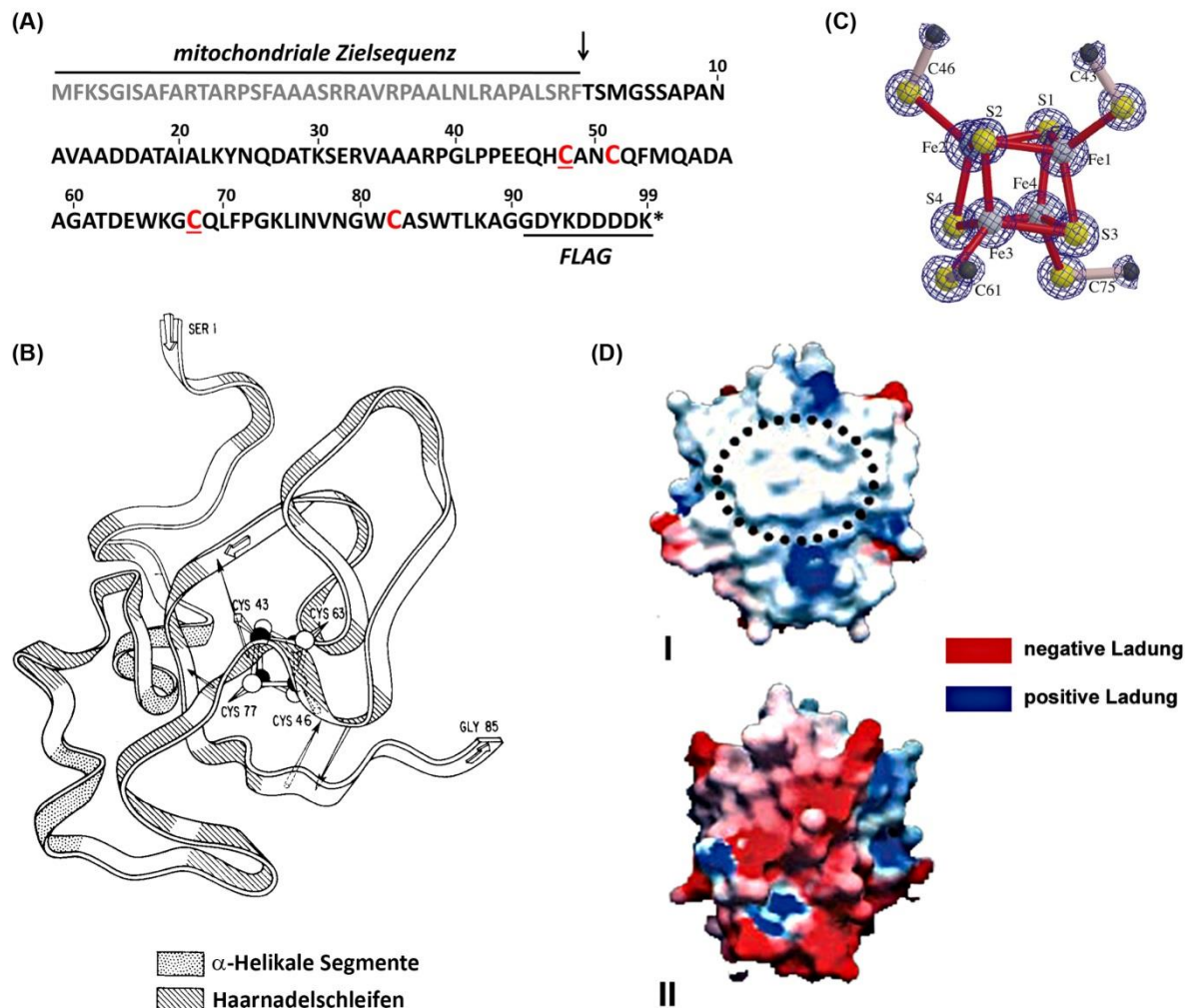


Abbildung 1.2.1 HiPIP aus *Allochrotrium Vinosum*: (A) Aminosäuresequenz von HiPIP aus *A. vinosum* mit mitochondrialer F1 β -Präsequenz und FLAG-Tag. (B) Sekundärstruktur von oxidiertem HiPIP aus *A. vinosum*, entschlüsselt mit Röntgenkristallographie bei einer Auflösung von 2.0 Å, modifiziert nach (Carter et al, 1974)). Alle vier Cysteine werden zur Koordination des kubischen [4Fe-4S]-Clusters genutzt. (C) Elektronendichtevertellung in der Region der Bindetasche des [4Fe-4S]-Clusters von HiPIP, isoliert aus *T. tepidum*, Röntgenkristallograpie mit einer Auflösung von 0,8 Å (Liu et al, 2002). (D) Die Oberflächenladungsverteilung auf HiPIP aus *T. tepidum*. Das Protein ist von der proximal (I) und der distal (II) zum Fe/S-Cluster orientierten Seite dargestellt. Die proximale Oberfläche bildet ein großes hydrophobes Areal (schwarze Punkte), welches vermutlich zur Dimerisierung und zum anschließenden Elektronentransfer genutzt wird (Kerfeld et al, 1998). Die distale Seite ist hydrophil und vor allem negativ geladen (Abbildung verändert nach (Nogi et al, 2000)).

HiPIPs (High Potential Iron-Sulfur Protein) gehören zur Familie der Ferredoxine. In der Regel sind es kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 6 und 10 kDa (Liu et al, 2002), welche in ihrem Zentrum in einer stark hydrophoben Höhlung einen kubischen [4Fe-4S]-Cluster tragen (Kerfeld et al, 1998). Die Mitglieder der HiPIP-Familie fungieren vor allem als lösliche Elektronentransportproteine in phototrophen Eubakterien (Bartsch, 1978). Hierbei stellen sie die Anbindung zwischen den membrangebundenen, photosynthetischen Reaktionszentren und dem Cytochrome bc_1 -Komplex her (Nogi et al, 2000). Man findet sie im periplasmatischen Raum dieser phototrophen Eubakterien. Der Fe/S-Cluster kann die zwei Oxidationszustände $[4Fe-4S]^{2+}$ und $[4Fe-4S]^{3+}$ einnehmen. HiPIP-Proteine teilen sich die Eigenschaft eines hohen Reduktionspotentials, wobei die Primärstruktur, die Gesamtladung sowie die Größe stark zwischen unterschiedlichen Spezies variieren können (Christ, 2011; Liu et al, 2002). Abbildung 1.2.1 gibt einen groben Überblick über die mittels Röntgenkristallographie bestimmte dreidimensionale Struktur (Abb. 1.2.1 B, C) und die wichtigsten Oberflächencharakteristika (Abb 1.2.1, D) von HiPIP, isoliert aus *A. vinosum* und *T. tepidum*. Zudem ist die Aminosäuresequenz eines in dieser Dissertation verwendeten HiPIP-FLAG-Konstrukts dargestellt (Abb. 1.2.1, A). Es konnte gezeigt werden, dass HiPIP in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* erfolgreich maturiert wird (Muhlenhoff et al, 2011).

Die Reinigung von größeren Mengen HiPIP aus den Mitochondrien von *S. cerevisiae* erwies sich, wie erwartet, als aufwendig und wird daher im Folgenden im Detail dargelegt. Beim ersten Versuch der Reinigung wurde HiPIP mit einem C-terminalen Myc-Tag unter der Kontrolle des starken TDH3-Promotors von einem 2 μ -Plasmid mit Hilfe einer mitochondrialen F1 β Präsequenz in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* überexprimiert (Christ, 2011). Die Expression erfolgte in einer Wildtyphefe und in einer Gal-*ARH1*-Zelle, welche durch Wachstum in glucosehaltigem Minimalmedium für das ISC-Gen *ARH1* depletiert worden war. In den erstgenannten Zellen war davon auszugehen, dass der Großteil HiPIPs in der Holo-Form vorlag, wohingegen in den *ARH1*-depletierten Zellen vor allem die Apo-Form des [4Fe-4S]-Proteins dominierte. Für die Proteinreinigungen von HiPIP-Myc wurde ein Drei-Schritt-Reinigungsverfahren gemäß Abbildung 1.2.2 entwickelt. Hefezellen wurden in glucosehaltigem Minimalmedium gemäß Kapitel 4.7.9 angezogen und anschließend zunächst die Mitochondrien gemäß Kapitel 4.6.3 isoliert. Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie verwendet (für experimentelle Details, siehe Kapitel 4.7.9).

- (A) Stammhintergrund:** W303-1A
Expressionsplasmid: 426 F1 β HiPIP-Myc
Kulturbedingungen: Minimalmedium, 2 % (w/v) Glucose, alle proteinogenen Aminosäuren (-Ura), 50 μ M Fe-Ammoniumcitrat

① **Präparation von Mitochondrien**

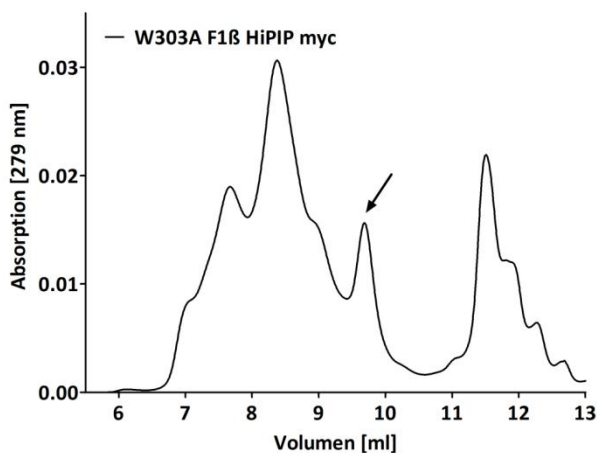
② **Anionenaustauschchromatographie**

Anionenaustauschmaterial: Q-Sepharose, fast flow
 Elutionspuffer: 40 mM Tris-HCl pH8,0, 100-210 mM NaCl

③ **HPLC Gelfiltration**

Gelfiltrationssäule: Shodex KW-802.5
 HPLC-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 8,0
 Flussrate: 0,5 ml/min, 4 °C

(B)



(C)

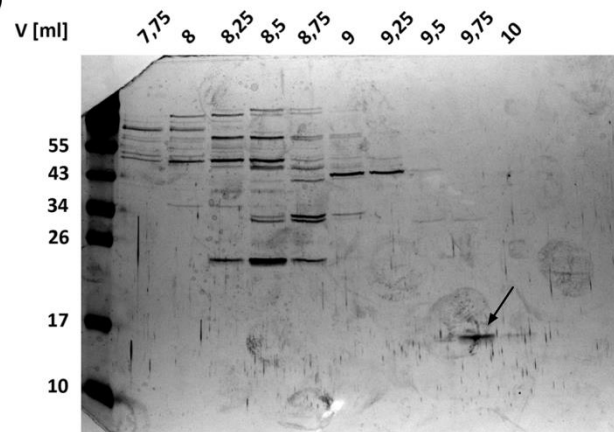


Abbildung 1.2.2 Reinigung von HiPIP-Myc aus den Mitochondrien von *S. cerevisiae*. Eine an ein Myc-Tag fusionierte Version von HiPIP aus *A. vinosum* wurde in den Mitochondrien des Wildtyps und verschiedener ISC-Mutanten von *S. cerevisiae* überexprimiert und in einem Drei-Schritt-Verfahren gereinigt. **(A)** Im ersten Reinigungsschritt wurden die Mitochondrien isoliert. Danach erfolgte eine Ionenaustauschchromatographie. Das Eluat des Anionenaustauschers wurde ankonzentriert und durch eine HPLC-Gelfiltrationschromatographie gereinigt. **(B)** HPLC Gelfiltration-Elutionsprofil und **(C)** Silberfärbung eines SDS-Gels der gesammelten Fraktion mit HiPIP-Myc aus einer Wildtyphefe. HiPIP eluierte in der 10 ml Fraktion (schwarzer Pfeil in (B) und (C)).

Da das Eluat des Anionenaustauschers größere Verunreinigungen mit Fremdproteinen aufwies, wurde es in einem dritten Schritt mittels Gelfiltration weiter gereinigt (Abb. 1.2.2, B; für experimentelle Details, siehe Kapitel 4.7.9). Die Gelfiltration des Ionenaustauschereluates lieferte eine hochreine Fraktion mit HiPIP-Myc (Abb. 1.2.2, C).

Obwohl HiPIP mit dieser Methode sowohl aus dem Wildtyp als auch aus einer Gal-*ARH1*-Zelle gereinigt werden konnte, ließ sich nur das Protein aus der Wildtyphefe in der anschließend durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchung nachweisen (Daten nicht gezeigt). Die geringen Mengen an gereinigtem HiPIP-Protein aus Gal-*ARH1*-Zellen fielen unter die Detektionsgrenze des verwendeten Massenspektrometers, sodass diese konventionelle Reinigungsstrategie am Ende nicht zum gewünschten Erfolg führte. Höhere Ausbeuten wurden letztendlich durch die Verwendung des alternativen, immunogenen FLAG-Tags erzielt, welches eine native Elution des Proteins nach Bindung durch einen entsprechenden Antikörper erlaubte. Das FLAG-Tag wurde anstelle des Myc-Tags an den C-Terminus des HiPIP-Konstrukts fusioniert und, wie oben beschrieben, in *S. cerevisiae* exprimiert. HiPIP-FLAG wurde aus den zuvor isolierten Mitochondrien der Wildtyphefen und der Gal-*ARH1*-Zellen mit Anti-FLAG-M2-Affinitätsgel der Firma Sigma Aldrich immunpräzipitiert und mit Hilfe eines von der gleichen Firma bezogenen FLAG-Peptids nativ eluiert (Abb. 1.2.3, A). Das auf diese Art eluierte Protein wurde mit der bereits beschriebenen HPLC-basierten Gelfiltration hochrein gereinigt (für weitere Details, siehe Kapitel 4.7.9).

(A)

Stammhintergrund: W303-1A**Expressionsplasmid:** 426 F1 β HiPIP-FLAG**Kulturbedingungen:** Minimalmedium, 2 % (w/v) Glucose, alle proteinogenen Aminosäuren (-Ura), 50 μ M Fe-Ammoniumcitrat① **Präparation von Mitochondrien**② **Immunaффinitätsreinigung und native Elution**

Gel-gekoppelte Antikörper: anti-Flag-M2-Affinitätsgel, Sigma Aldrich

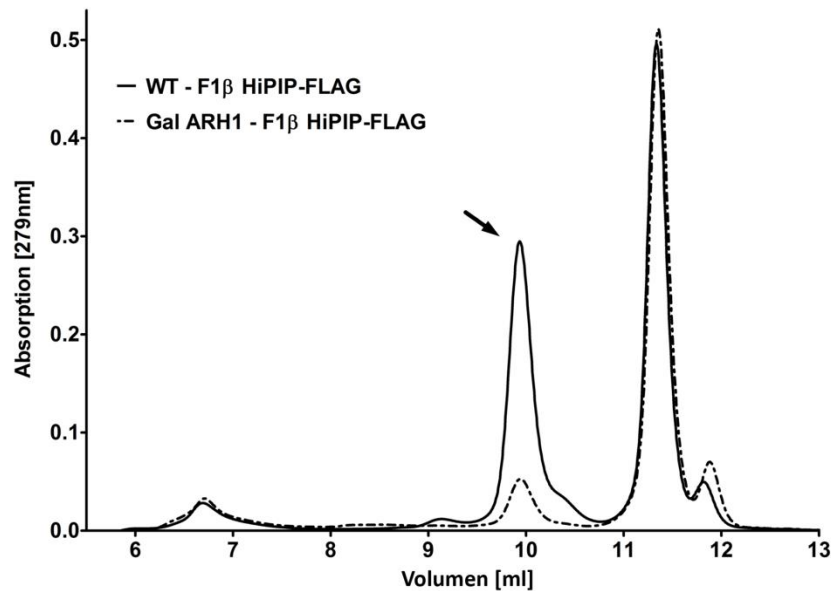
Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 250 μ g/ml FLAG-Peptid③ **HPLC Gelfiltration**

Gelfiltrationssäule: Shodex KW-802.5

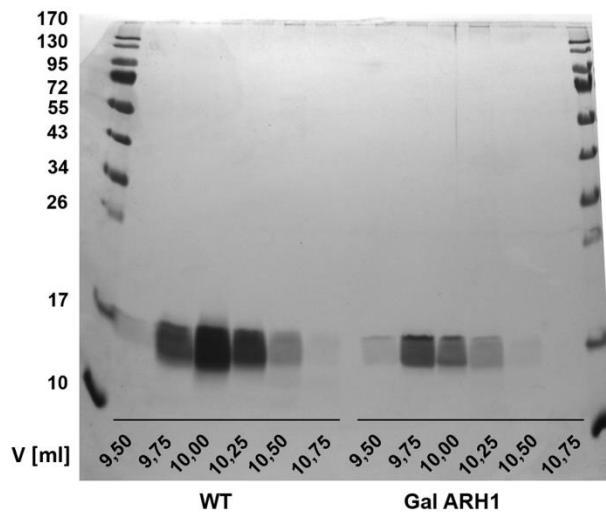
HPLC-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 7,4

Flussrate: 0,5 ml/min, 4 °C

(B)



(c)



(D)

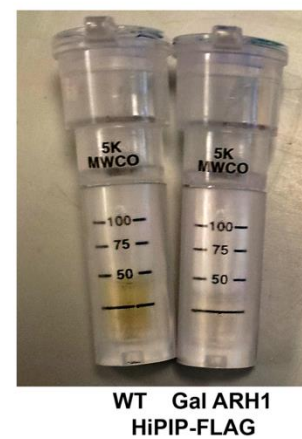


Abbildung 1.2.3 Reinigung von HiPIP-FLAG aus Mitochondrien von *S. cerevisiae*. Eine FLAG-getaggte Version von HiPIP aus *A. vinosum* wurde in drei Schritten gereinigt. **(A)** Reinigungsprotokoll: Im ersten Schritt wurden die Mitochondrien isoliert, aus denen wiederum HiPIP-FLAG durch eine Affinitäts-Reinigung mit Anti-FLAG-M2 Affinitäts-Gel gereinigt wurde. Die Elution des immunpräzipitierten Proteins erfolgte nativ mit FLAG-Peptid. Im dritten Reinigungsschritt erfolgte eine Gelfiltrationschromatographie. **(B)** Gelfiltration-Elutionsprofil und **(C)** Silberfärbung eines SDS-Gels der entscheidenden Fraktionen mit HiPIP-FLAG. **(D)** Konzentrat der Präparation von HiPIP-FLAG aus einer Wildtyp- (links) und einer Gal-*ARH1*-Zelle (rechts).

Mit Hilfe dieses modifizierten Drei-Schritt-Reinigungsverfahrens war es möglich größere Mengen an hochreinem HiPIP-FLAG-Protein aus den Mitochondrien von Gal-*ARH1*-Zellen zu reinigen (Abb. 1.2.3, B, C). HiPIP-FLAG aus Wildtypzellen zeigte eine Rotfärbung, welche auf einen [4Fe-4S]-Cluster des Holo-Proteins hinweist (Abb. 1.2.3, D). Die Probe aus Gal-*ARH1*-Zellen enthielt hingegen vor allem Apo-HiPIP-FLAG und wirkte daher farblos.

Es gelang ebenfalls HiPIP-FLAG aus einer Gal-*ISA1*-Mutante zu reinigen, jedoch fiel die Menge an Protein, verglichen mit dem aus der Gal-*ARH1*-Zelle, deutlich geringer aus und lag unter der Nachweisgrenze des im Weiteren verwendeten Massenspektrometers (Daten nicht gezeigt).

1.3 Mitochondriale Fe/S-Proteine akkumulieren eine Schwefel-Spezies auf den Thiol-Gruppen ihrer Cysteinliganden in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie.

Im Folgenden wurden die beiden Proteinisolate HiPIP-FLAGS aus Kapitel 1.2 hinsichtlich ihres Molekulargewichts in einem Massenspektrometer analysiert, um eine mögliche Cystein-SH-Modifikation auf dem Apo-Fe/S-Protein zu identifizieren. Dies wurde in Kooperation mit Prof. Lars I. Leichert an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Im Hinblick auf die geringen Proteinmengen musste zunächst eine alternative Methode der Probenvorbereitung und der Messung HiPIPs am Massenspektrometer erarbeitet werden, bei der die Proben letztendlich manuell mit Hilfe von ZipTips C18 der Firma Merck Millipore unmittelbar vor der Messung denaturiert und in einem Methanol-, Essigsäuregemisch aufgenommen wurden (siehe Kapitel 4.7.10). Zudem wurden die Proben für die Messung der molekularen Masse in eine metallbedampfte Glaskapillare des Typs PicoTip EMITTER, EconoTip der Firma New Objective gegeben und auf diese Weise direkt in das Massenspektrometer injiziert. Durch dieses methodische Vorgehen gelang es, MS-Spektren für HiPIP-FLAG aus Wildtyp- und Gal-*ARH1*-Zellen aufzunehmen (Abb. 1.3.1, A, B). Die Messung erfolgte auf einem LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific, die gewonnenen ESI-MS-Spektren wurden im Anschluss an die Messung mit Hilfe des Xtract-Algorithmus der Xcalibur™ Software (Thermo Fisher Scientific) dekonvuliert.

MW HiPIP-FLAG: 10420,4 Da

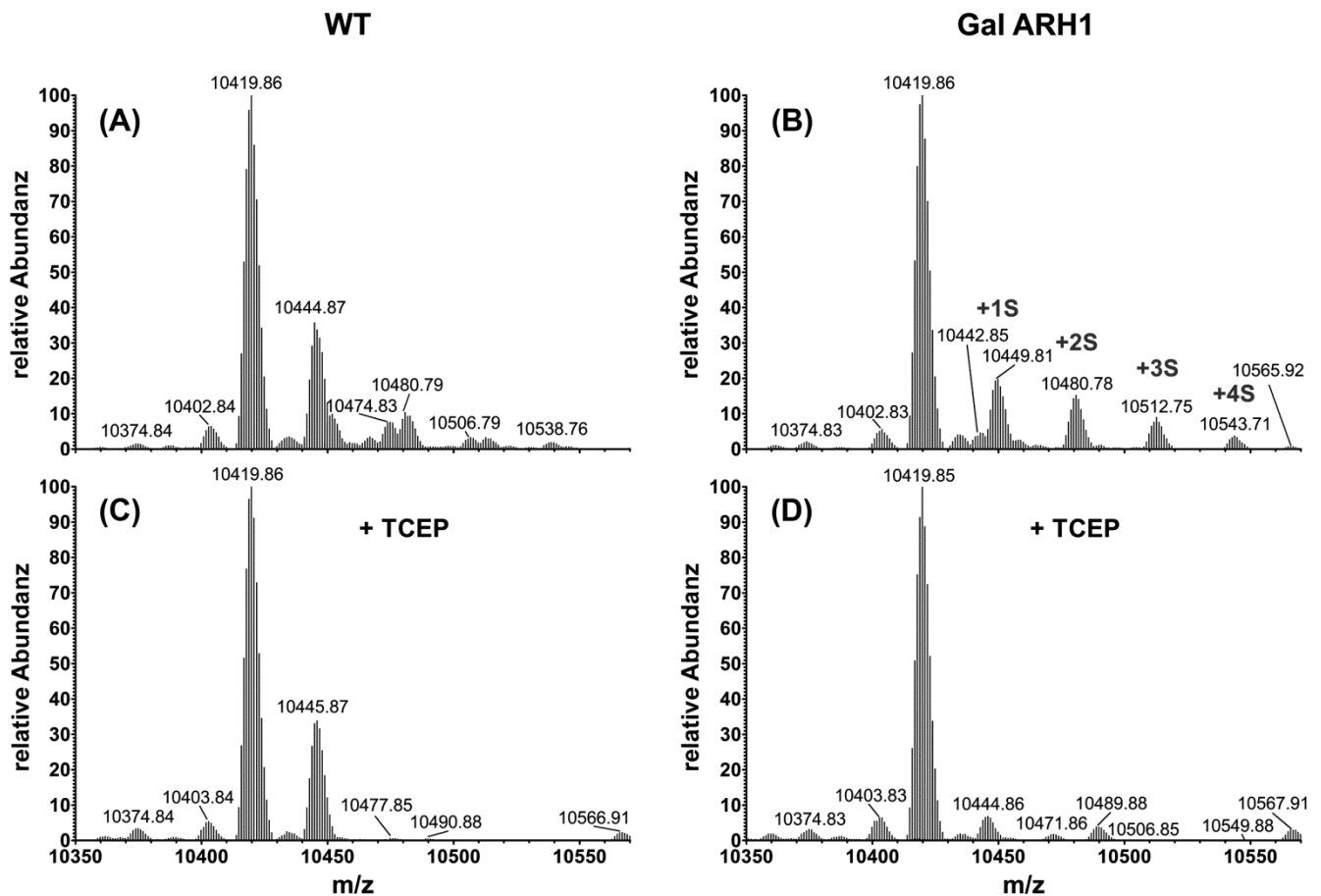


Abbildung 1.3.1 Zellen mit Defekten in der mitochondrialen Fe/S-Cluster Assemblierungsmaschinerie akkumulieren eine Schwefel-Spezies auf den Cystein-Liganden ihrer Apo-Fe/S-Proteine. Mitochondrien wurden aus Wildtyp- (A) und Gal-*ARH1*-Zellen (B) isoliert, welche eine an ein FLAG-Tag fusionierte Version von HiPIP aus *A. vinosum* überexprimierten. HiPIP-FLAG wurde gemäß Abbildung 1.2.3 aus Mitochondrien gereinigt. Das Massenspektrum des Proteins wurde durch Elektrospray-Ionisation in einem LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer aufgenommen. MS-Spektren wurden für einen Teil der Proben für das unbehandelte, gereinigte Protein detektiert (A, B). Ein weiterer Teil der Probe wurde unmittelbar vor der Messung mit 100-fach molarem Überschuss an TCEP reduziert (C, D). In (B) ist die Anzahl der Schwefeladdukte von HiPIP in Gal-*ARH1*-Zellen indiziert (+S).

Das theoretische Molekulargewicht HiPIPs ist 10420,4 Da (ProtParam-Web-Tool). Das zugehörige Molekül-Ion Signal wurde im verwendeten LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer mit 10419,86 Da für HiPIP-FLAG, isoliert aus den Mitochondrien von Wildtypzellen (Abb. 1.3.1, A) sowie aus einer Gal-*ARH1*-Zelle (Abb. 1.3.1, B), nachgewiesen. Zusätzlich wurden im Massenspektrum des isolierten Proteins aus Gal-*ARH1*-Zellen Molekulargewichtsspezies mit einer diskreten Massenzunahme von +30 bis +32 Da detektiert. In den Massenspektren von Wiederholungsexperimenten waren diese Spezies teils sogar ähnlich abundant vertreten wie das Molekül-Ion Signal des unmodifizierten Proteins (Daten nicht gezeigt).

Ein Teil der Proben in Abb. 1.3.1, A, B wurde zudem unmittelbar vor der ESI-MS-Messung mit TCEP reduziert, um zu überprüfen, ob es sich bei den +30 bis +32 Da Addukten um Schwefelkomponenten handelte, die in Form von Disulfidbrücken an Cysteinseitenketten der Proteine angefügt waren (Abb. 1.3.1, C, D). In der Tat ließen sich die beobachteten Massenaddukte auf HiPIP-FLAG aus Gal-*ARH1*-Zellen mit TCEP reduktiv entfernen (Abb. 1.3.1, D). Dies ließ vermuten, dass HiPIP, welches in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie vor allem in seiner Apo-Form vorliegt, eine Schwefelspezies auf seinen Cysteinliganden akkumuliert. Diese Schwefelspezies war sowohl in der Massenspektrometrie als auch im MPB-11-Modifikationsexperiment sensitiv gegenüber Reduktionsmitteln wie TCEP oder DTT. Es stellte sich jedoch die Frage, warum die messbare Massenzunahme nicht exakt +32 Da (+S) oder im Fall der Ausbildung einer Polysulfidbrücke zwischen zwei Cystein-SH-Gruppen und einem gebrückten Schwefel +30 Da (+S, -2H) war. Die aufgenommenen Spektren wurden mit dem Xtract-Algorithmus der Xcalibur™ Software (Thermo Fisher Scientific) dekonvuliert, wobei die beobachtete Abweichung von +/- 1 Da innerhalb des Fehlers der Massenhöchstwerte liegt, die diese Software für ein Protein errechnet. Um die korrekte Masse aus den dekonvulierten Massenspektren zu erhalten, muss das Molekül-Ion Signal integriert und der zugehörige Centroid ermittelt werden. Diese Berechnungen wurden von Prof. Lars I. Leichert für das Massenspektrum in Abbildung 1.3.1, B durchgeführt (Abb. 1.3.2).

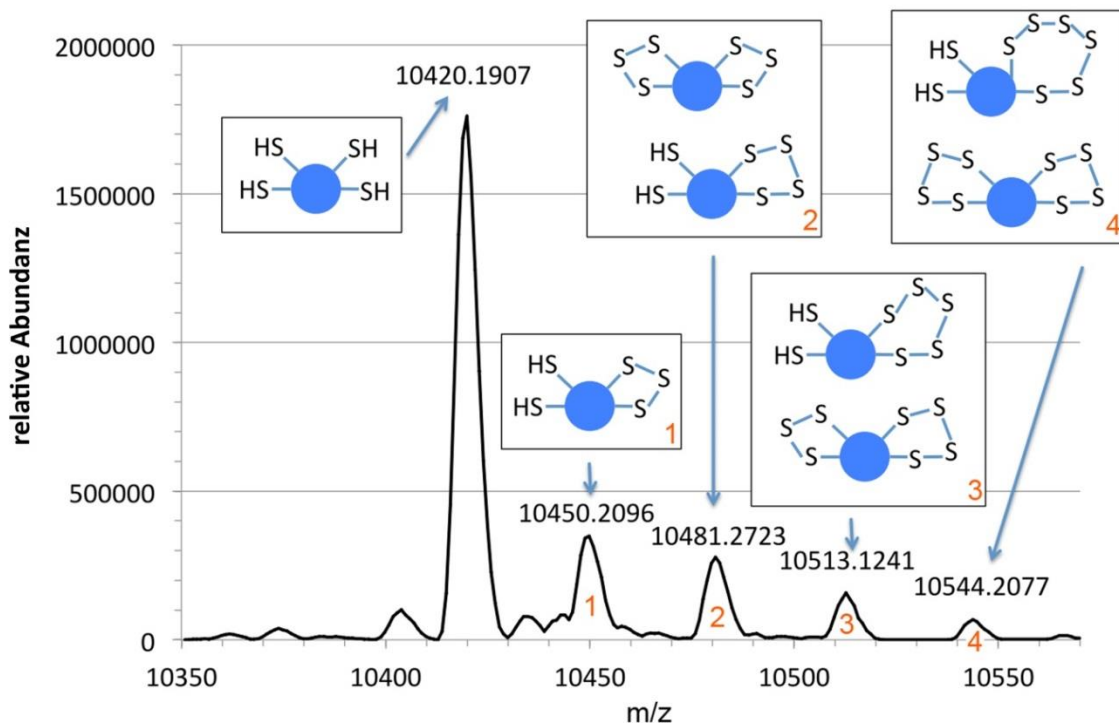


Abbildung 1.3.2 Zellen mit Defekten in der mitochondrialen Fe/S-Cluster Assemblierungsmaschinerie akkumulieren Polysulfidaddukte auf den Cystein-Liganden ihrer Apo-Fe/S-Proteine. Im Massenspektrum von HiPIP-FLAG aus Gal-*ARH1*-Zellen (Abb. 1.3.1, B) wurden die einzelnen Molekül-Ion Signale integriert und der jeweilige Centroid mathematisch bestimmt. Den errechneten Massespezies lassen sich die dargestellten Polysulfidaddukte zuordnen.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie zeigen, dass Apo-Fe/S-Proteine in Zellen mit Defekten in der Kern-ISC-Maschinerie Polysulfidaddukte auf ihren Cysteinseitenketten akkumulieren. Ob es sich bei dieser Modifikation *in vivo* um ein Polysulfid oder vielmehr um ein Persulfid oder ein Polysulfan handelt, bleibt zu ermitteln. Die hier beobachtete oxidative Ringbildung zwischen den Cystein-Schwefelmodifikationen könnte auch ein Resultat der Reinigung bzw. der Elektrospray-Ionisation in Anwesenheit von organischen Säuren sein. Abbildung 1.3.2 veranschaulicht graphisch die den einzelnen Molekül-Ion Signalen zugehörigen Schwefelmodifikationen. Zusammen mit der Tatsache, dass sich die beobachtete Cystein-SH-Modifikation *in vivo* reduktiv entfernen ließ, legen diese Daten jedoch nahe, dass Apo-Fe/S-Proteine in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie mit einem sulfanen Schwefel modifiziert werden.

In den Massenspektren aus Abbildung 1.3.1 fiel eine weitere Modifikation des gereinigten Proteins auf. In allen aufgenommenen Spektren in Abbildung 1.3.1 sticht ein zusätzlicher TCEP-insensitiver Höchstwert hervor (Abb. 1.3.1, C: MW=10445,87). Die Massendifferenz zum unmodifizierten Protein ist + 26 Da. Es konnte gezeigt werden, dass viele in der Massenspektrometrie gemessene Peptide oder Proteine eine Acetaldehyd-Schiff-Base-Modifikation an einem Lysinrest oder am Aminoterminus aufweisen (Braun et al, 1995; Chalkley et al, 2008). Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei somit um ein artifizielles Oxidationsprodukt, welches im Reinigungs- oder Probenvorbereitungsprozess oder bereits *in vivo* eingeführt wurde. Da die Modifikation jedoch unabhängig in allen vier Spektren in Abbildung 1.3.1 in unterschiedlich starkem Maße nachzuweisen war und offensichtlich auf Grund der TCEP-Insensitivität nichts mit der eigentlichen Fragestellung zu tun hatte, wurde sie nicht weitergehend charakterisiert. Zudem wurden wiederholt während der Etablierung der Reinigung und der massenspektrometrischen Messung HiPIPs Massenspezies mit einer Massenzunahme von jeweils +16 Da zum Molekül-Ion Signal nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Diese Masse ist indikativ für eine Oxidation des Proteins mit jeweils einem Atom Sauerstoff und veranschaulicht die Empfindlichkeit des gereinigten Proteins gegenüber oxidativen Modifikationen.

1.4 Physiologische Relevanz der Cystein-SH-Modifikation von Apo-Fe/S-Proteinen

Es ließen sich jedoch auch für HiPIP aus Wildtyphefe TCEP-sensitive Spezies mit einer Molekulargewichtszunahme von +30 bis +32 Da über dem Molekül-Ion Signal des unmodifizierten Proteins nachweisen. Der Anteil dieser Spezies am Massenspektrum des Proteins aus Wildtypzellen war jedoch deutlich geringer als in Gal-*ARH1*-Zellen (Abb. 1.3.1, A, C und Abb. 1.4.1).

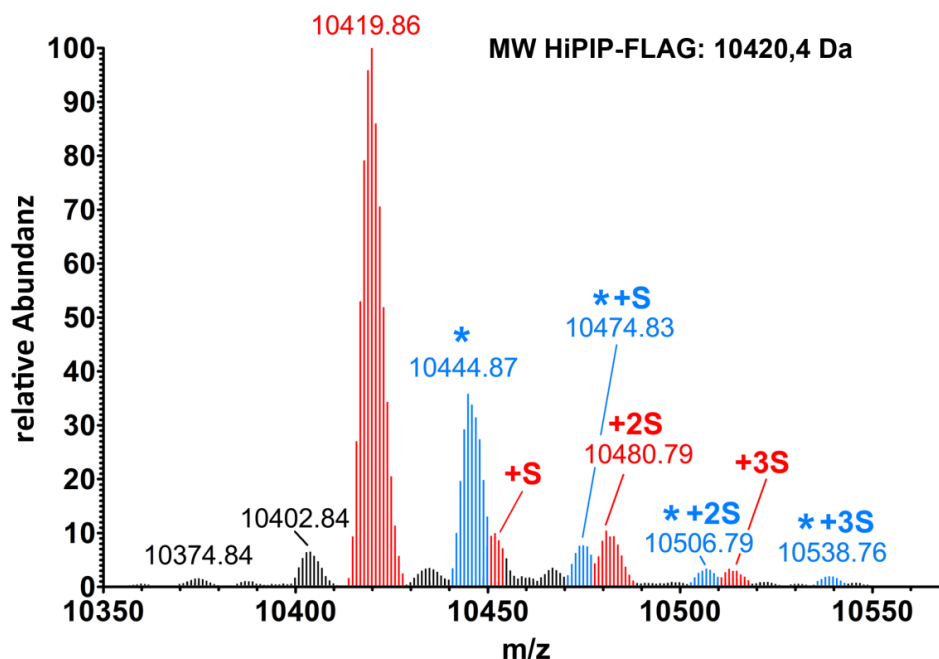


Abbildung 1.4.1 Das Massenspektrum von HiPIP-FLAG aus Wildtyp-Mitochondrien zeigt Cystein-S-Thiolierungen auf Fe/S-Cluster koordinierenden Cysteinliganden. Das Massenspektrum von HiPIP aus Wildtypzellen zeigt neben dem Molekül-Ion Signal des unmodifizierten Proteins bei 10419,86 drei weitere Massenhöchstwerte mit +30 bis +32 Da höherem Molekulargewicht, die Schwefeladdukte von HiPIP sein könnten (+S, rote Markierung). Der mit einem blauen Stern markierte Massenhöchstwert entspricht dem Molekül-Ion Signal des HiPIP-Proteins mit einer Acetaldehyd-Schiff-Base-Modifikation (siehe auch Abbildung 1.3.1, C). Auch hierzu lassen sich drei Schwefeladdukte nachweisen (+S, blau).

Die Beobachtung, dass sich Schwefelspezies ebenfalls in geringem Maße in Wildtypzellen finden ließen, führte zu der Fragestellung, ob die beobachtete Schwefelmodifikation auf Apo-Fe/S-Proteinen lediglich das Endprodukt einer defekten ISC-Maschinerie darstellt, oder ob es sich hierbei viel eher um einen physiologischen, aktiven Schutzmechanismus der Zelle für die Cysteinliganden nicht fertig gereifter Fe/S-Proteine handelt.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden diverse Cystein-Punktmutanten von HiPIP-FLAG mit Hilfe einer Mutagenese-PCR generiert und in den Mitochondrien einer Wildtypzelle von *S. cerevisiae* exprimiert. Ziel dieses Vorgehens war es, den Oxidationszustand der Cysteinliganden einer HiPIP-Mutante zu bestimmen, welche nicht stabil einen [4Fe-4S]-Cluster im Wildtyp binden kann. Es zeigte sich, dass eine Mutation der Cysteine C48 oder C68 (Sequenz siehe Abb. 1.2.1, A) zu Alanin

unvereinbar mit der Proteinstabilität HiPIPs in den Mitochondrien der Hefe war (Daten nicht gezeigt). Daher wurde eine mildere Mutation der beiden Fe/S-Cluster-Liganden zu Serin vorgenommen. Die Hydroxylseitenkette der Aminosäure Serin ist in der Lage, partiell die Funktion eines Cysteinliganden zu übernehmen, die Stabilität des Fe/S-Clusters ist in der Regel jedoch stark verringert und das Redoxpotential verändert (Mansy et al, 2002). Abbildung 1.4.2, A zeigt eine *in vivo* Fe⁵⁵-Markierung von Wildtypzellen, die die Wildtypform HiPIPs und die zwei Cysteinmutanten C48/S und C68/S des Proteins überexprimierten. Die Zellen wurden zunächst für das Element Eisen verhungert und im Anschluss für 2 h in Medium angezogen, welches radioaktives Fe⁵⁵ enthielt. Die Zellen wurden lysiert und eine Immunpräzipitation gegen HiPIP-FLAG mit anti-FLAG-M2-Affinitätsgel durchgeführt. Die Messung der mit dem Immunpräzipitat assoziierten radioaktiven Strahlung in einem Szintillationszähler erlaubte Rückschlüsse auf die Menge an koimmunpräzipitiertem Fe⁵⁵ in der Probe und damit auf die Menge an inkorporierten Fe/S-Clustern in HiPIP-FLAG. Es stellte sich heraus, dass die C68/S-Punktmutante sehr gut den Verlust der Cystein-SH-Gruppe kompensieren konnte, wohingegen die C48/S-Mutante vor allem in der Apo-Form in Wildtyphefezellen vorlag (Abb. 1.4.2, A).

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde eine Methode der MPB-11-Modifikation in Mitochondrien von *S. cerevisiae* etabliert, um die Zugänglichkeit der Cysteinseitenketten von Apo-Fe/S-Proteinen *in vivo* untersuchen zu können (Christ, 2011). Maleimid-PEG₁₁-Biotin (MPB-11) ist eine Cystein-SH-Sonde der Firma EZ Link, Thermo Fisher Scientific. Die reaktive Maleimid-Kopfgruppe dieser Cystein-SH-Sonde reagiert unter geeigneten Reaktionsbedingungen exklusiv mit freien Thiolgruppen (Makmura et al, 2001). Das Produkt dieser Reaktion ist äußerst stabil. Eine kovalente Addition der MPB-11-Sonde an ein Zielprotein erhöht dessen molekulares Gewicht um 1 kDa. Diese Zunahme der molekularen Masse kann im SDS-Gel durch ein verändertes Laufverhalten nachgewiesen werden.

Nachfolgend ist das Reaktionsprodukt einer Maleimidmodifikation (Abb. 1.4.3, A) und ein Ablaufschema der MPB-11-Modifikation mitochondrialer Proteine (Abb. 1.4.3, B) zu sehen. Betrachtet man Abbildung 1.4.3, C, die Modifikation einer Wildtypzelle, welche mitochondrial das bakterielle [4Fe-4S]-Protein HiPIP-Myc aus *A. vinosum* exprimiert, so sieht man drei Spuren im SDS-Gel, beschriftet mit (a)-(c). Betrachtet man hierbei zunächst Spur (c), so wird das Prinzip der MPB-11-Modifikation verständlich. Ein Teil des mitochondrialen Lysats wurde, wie in Kapitel 4.7.7 beschrieben, zunächst mit Hilfe von Tris-(2-Carboxy-Ethyl-Phosphine) (TCEP) reduziert und im Anschluss mit MPB-11 modifiziert. Es folgte das Lösen des Präzipitats in einem Tris-HCl-Puffer und die unvollständige Modifikation freier Cystein-SH-Gruppen mit MPB-11. Wurde das unter diesen Bedingungen modifizierte HiPIP-Myc in der Immunfärbung detektiert, so ergab sich in Spur (c) ein Leiternmuster mit fünf Banden. Die unterste dieser Banden entspricht unmodifiziertem Protein

(Abb. 1.4.2 C, Bande 0, Spur (a)), wohingegen die übrigen Banden jeweils HiPIP mit 1, 2, 3, oder 4 MPB-11-modifizierten Cysteinliganden repräsentieren (Abb. 1.4.2, C, Banden 1-4, Spur (c)). Wurde HiPIP, überexprimiert in den Mitochondrien des Wildtyps, unter nativen, nicht denaturierenden oder reduzierenden Bedingungen modifiziert, so konnten nahezu keine höheren Molekulargewichtsbanden im SDS-Gel nachgewiesen werden (Abb. 1.4.2, C, Spur (b)). Das mitochondriale Porenprotein (Por1) hingegen zeigte in der Immunfärbung ein Modifikationsmuster mit drei diskreten Banden im gleichen Extrakt, was einen Beweis für die Funktionalität der Maleimidmodifikation darstellt (Christ, 2011). Der in das HiPIP inkorporierte Fe/S-Cluster schirmte die Cysteinliganden im Wildtyp vor einer Maleimidmodifikation ab.

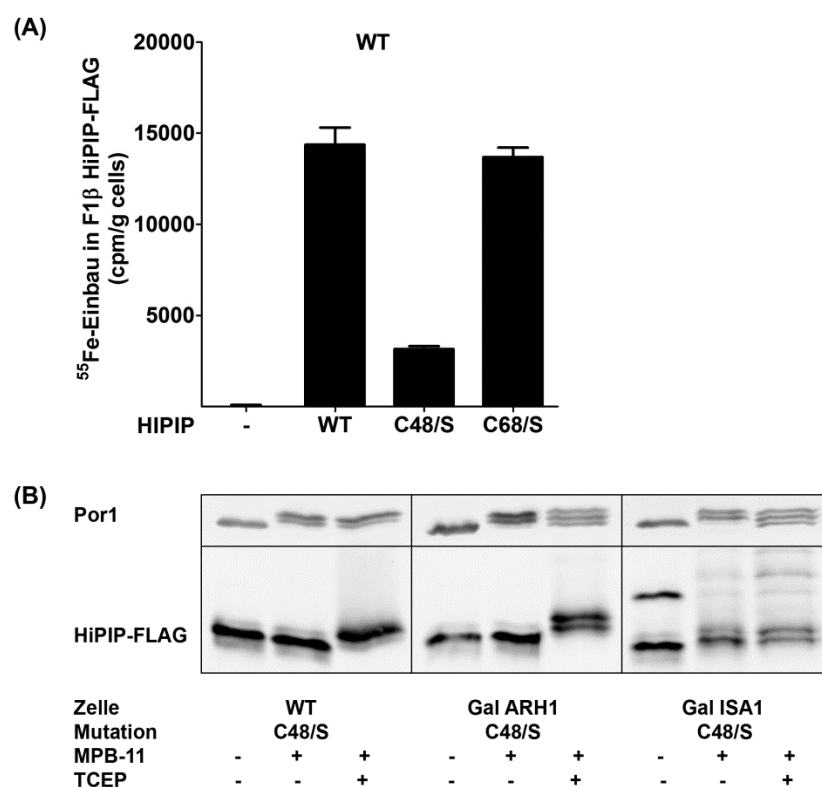


Abbildung 1.4.2 Eine C48/S Punktmutation in HiPIP-FLAG verhindert die Insertion eines stabilen Fe/S-Clusters in Wildtypzellen, dennoch sind die Cysteinliganden des Proteins vor einer Modifikation mit MPB-11 geschützt. **(A)** Wildtyp HiPIP-FLAG, eine C48/S und eine C68/S Variante wurden jeweils in den Mitochondrien von Wildtyphefzellen überexprimiert. Die Zellen wurden für 40 Stunden in glucosehaltigem Minimalmedium herangezogen, wobei die Kultivierung für die letzten 16 Stunden in eisenfreiem Medium stattfand. Im Anschluss erfolgten eine radioaktive Markierung der Zellen mit radioaktivem Fe^{55} entsprechend Kapitel 4.7.12, eine Lyse der Zellen und eine Präzipitation HiPIPs aus dem Lysat mit Hilfe von anti-FLAG Antikörpern. Die Menge an koimmunpräzipitiertem Fe^{55} wurde in einem Szintillationszähler ermittelt und auf das Nassgewicht der eingesetzten Zellen normalisiert. **(B)** Die C48/S-Variante HiPIP-FLAGs wurde in den Mitochondrien der angezeigten Stämme überexprimiert. Die Mitochondrien wurden isoliert und die Lysate entsprechend Abbildung 1.4.3 mit MPB-11 modifiziert und analysiert.

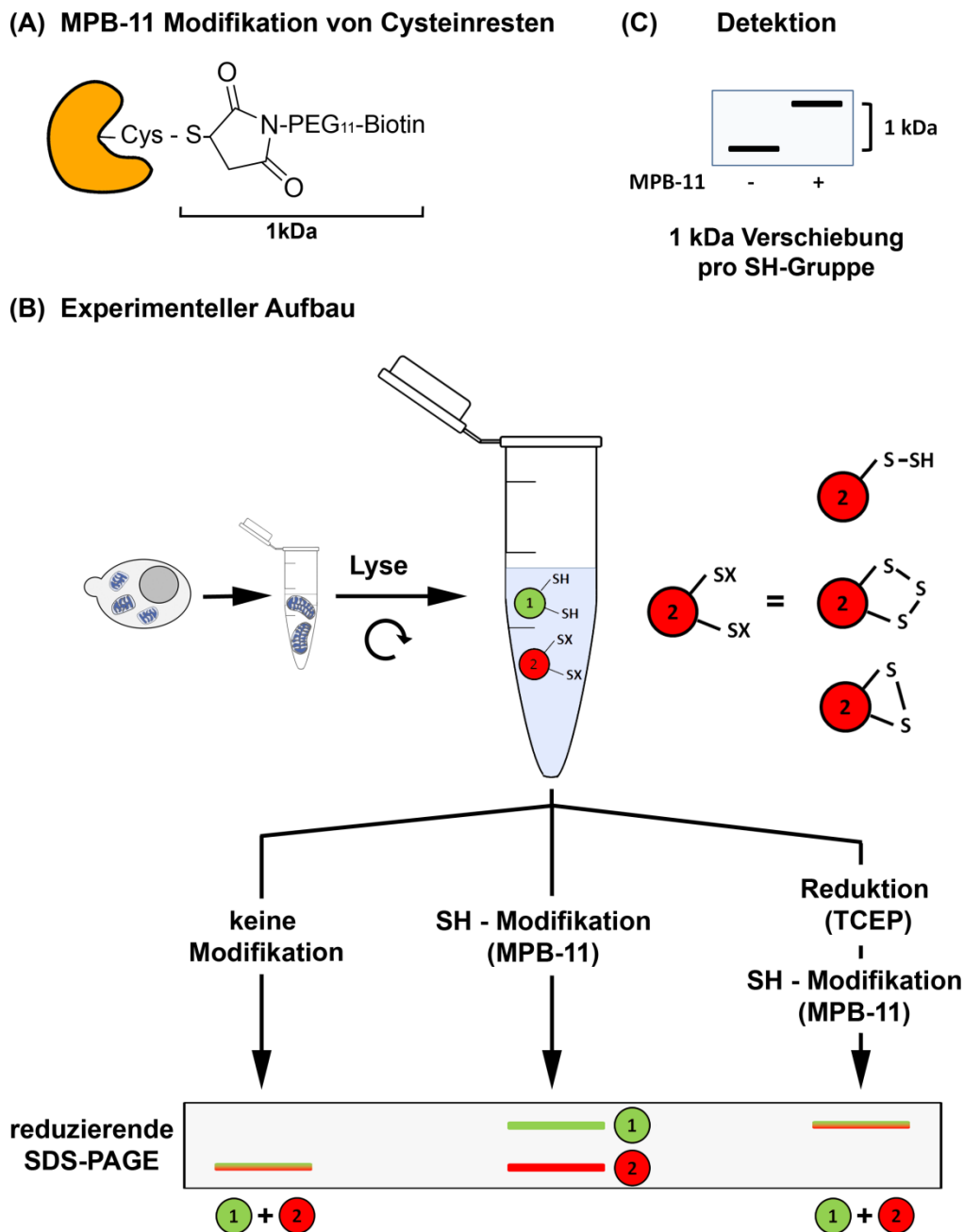


Abbildung 1.4.3 Experimenteller Aufbau für eine Modifikation von Cysteinseitenketten mit MPB-11. (A) Maleimid-PEG₁₁-Biotin (MPB-11) formt ein kovalentes Addukt an eine freie Cystein-SH-Gruppe. Die MPB-11-Modifikation wurde mit isolierten Mitochondrien gemäß dem experimentellen Aufbau in (B) ausgeführt. (C) Das mitochondriale Lysat einer Wildtypzelle wurde mit MPB-11 unter nicht reduzierenden Bedingungen (b) und nach TCEP-Reduktion (c) modifiziert. Die Zelle exprimiert eine mitochondrial lokalisierte, Myc-Tag fusionierte Version von HiPIP aus *A. vinsonum*. Die modifizierten Proben wurden zusammen mit einer unmodifizierten Kontrolle (a) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Myc-Tag durch eine Immundekoration mit α -Myc Antikörpern visualisiert. Mitochondriales Porin (Por1) diente hierbei als Lade- und Modifikationskontrolle. Die mit 1-4 nummerierten Banden korrespondieren mit einer entsprechenden Anzahl an stabil MPB-11 modifizierten Cysteinseitenketten (Abbildung modifiziert nach (Christ, 2011)).

Wurde die C48/S-HiPIP-Mutante in isolierten mitochondrialen Lysaten der in Abbildung 1.4.2, B zu sehenden Hefestämme wie oben beschrieben mit MPB-11 modifiziert, so ließen sich lediglich in einer Gal-*ISA1*-Zelle höhere Molekulargewichtsspezies von HiPIP nachweisen. Das artifizielle Apo-Protein konnte weder im Wildtyp noch in Gal-*ARH1*-Zellen mit der Cystein-SH-Sonde modifiziert werden. Die Analyse der C48/S-Mutante HiPIP-FLAGS deutet darauf hin, dass die Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen auch im Wildtyp abgeschirmt werden. Zur weiteren Unterstützung dieses Befundes sollte das Auftreten einer schützenden endogenen Modifikation der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen unter physiologischen Bedingungen belegt werden. Eine physiologische Situation, mit der Pro- und Eukaryoten nahezu überall auf unserem Planeten umgehen müssen, ist die Limitierung an frei für sie verfügbarem Eisen. Unter Eisenmangelbedingungen kommt die Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie je nach Schweregrad mehr oder minder zum Erliegen. Diese Bedingungen lassen sich experimentell simulieren, indem man Hefezellen 24 Stunden vor der Zellernte stark verdünnt und sie dann in eisenfreiem Minimalmedium anzieht. Dies führt zu einer Akkumulation von Apo-Fe/S-Proteinen.

Lysate von unter Eisenmangelbedingungen angezogenen Zellen, welche HiPIP-Myc überexprimierten, wurden, wie in Abbildung 1.4.3, A beschrieben, unter nativen Bedingungen mit MPB-11 modifiziert. Die Cysteinsonde wurde im Anschluss durch Zugabe von L-Cystein gequencht und HiPIP-Myc mit anti-Myc Antikörpern immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde in einer SDS-PAGE nach seinem Molekulargewicht aufgetrennt und die Maleimidmodifikation mit Hilfe des Bandenmusters analysiert (Abb. 1.4.4, A). Die Immunfärbung zeigte nahezu keine höheren Molekulargewichtsbanden HiPIPs im Wildtyp oder den beiden analysierten Kern-ISC-Mutanten (Gal-*ARH1*, Gal-*SSQ1*). Lediglich in Gal-*ISA1*-Zellen konnten unter eisenlimitierenden Bedingungen freizugängliche Cysteinseitenketten nachgewiesen werden. Letztere Beobachtung wurde auch in Gal-*ISA1*-Zellen gemacht, die mit ausreichenden Eisenmengen versorgt worden waren und deckt sich mit den in der Einleitung zu diesem Kapitel beschriebenen Daten zur Modifizierbarkeit von Apo-Fe/S-Proteinen in verschiedenen ISC-Mutanten (Christ, 2011). Folglich scheint die Depletion von Eisen keinen Einfluss auf das Modifikationsmuster HiPIPs in den untersuchten ISC-Mutanten zu haben.

Es blieb zu klären, dass in dem oben beschriebenen Experiment weder ein residualer Fe/S-Cluster auf HiPIP noch eine artifizielle Oxidation der Cysteinseitenketten des Proteins während der Probenvorbereitung für die Abschirmung der Cysteinliganden von Apo-HiPIP verantwortlich gewesen war. Hierzu wurde HiPIP-FLAG erneut unter Eisenmangelbedingungen in einer Wildtyphefe exprimiert und aus dem Zelllysate mit anti-FLAG Antikörpern immunpräzipitiert. Das präzipitierte Protein wurde im Anschluss in einem Tris-HCl-Puffer resuspendiert und direkt auf den Immunkügelchen mit MPB-11 modifiziert (Abb. 1.4.4, B). Ein Teil der Probe wurde zusätzlich

unmittelbar vor der Maleimidmodifikation mit TCEP reduziert (Abb. 1.4.4, B, rechte Spur). Nach Auftrennung aller Proben in einem SDS-Gel, Western-Blot und der Immundekoration mit anti-Myc Antikörpern konnten erneut lediglich in der zuvor reduzierten Probe höhere Molekulargewichtsspezies HiPIP-Mycs nachgewiesen werden. In diesem Experiment wurde eine vollständige Modifikation mit MPB-11 bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator erreicht.

Insgesamt legen diese Daten nahe, dass die Modifikation der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen auch in Wildtypzellen auftreten, vor allem auch unter Eisenmangelbedingungen. Es scheint sich hierbei folglich eher um einen physiologischen Schutzmechanismus für die freien Thiolgruppen der Cystein-Liganden von Fe/S-Proteinen in ihrer Apo-Form zu handeln als um eine Modifikation, die lediglich unter Bedingungen einer defekten ISC-Maschinerie auftritt.

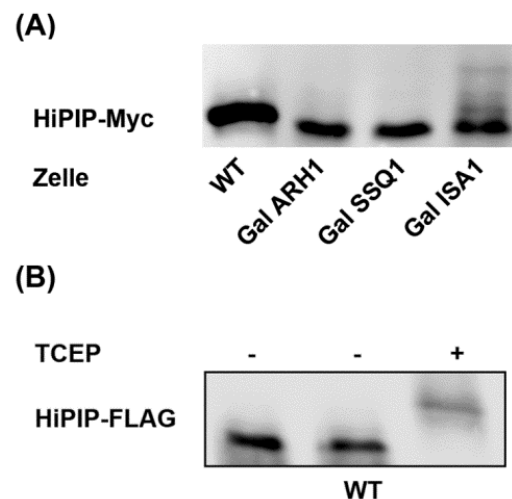


Abbildung 1.4.4 Apo-HiPIP-FLAG zeigt abgeschirmte Cysteinliganden in Wildtypzellen, welche unter Eisenmangelbedingungen angezogen wurden. (A) Wildtypzellen und die angezeigten *Gal-1-10*-Austausch-Zellen überexprimierten eine an ein Myc-Tag fusionierte Version von HiPIP aus *A. vinosum* in den Mitochondrien. Die Zellen wurden in eisenfreiem Medium angezogen, Zelllysate hergestellt und mit MPB-11 unter nicht reduzierenden und nicht denaturierenden Bedingungen modifiziert. HiPIP-Myc wurde im Anschluss immunpräzipitiert, in einer SDS-PAGE separiert und durch Immundekoration des Western-Blots mit α -Myc Antikörpern visualisiert. (B) HiPIP-FLAG wurde aus dem Zelllysate von Wildtypzellen, die in eisenfreiem Medium angezogen worden waren, mit anti-FLAG M2-Affinitäts-Gel immunpräzipitiert, die Immunkügelchen in Puffer resuspendiert und im Anschluss mit MPB-11 modifiziert. Ein Teil des Präzipitats wurde unmittelbar vor der Modifikation mit TCEP reduziert und mit TCA denaturiert (rechte Spur).

1.5 Wer ist für die Einführung einer Poly-S-Thiolierung in Apo-Fe/S-Proteine verantwortlich?

Es blieb die Frage zu klären, welche Komponenten der bekannten zellulären Sulfurtransferase-Systeme möglicherweise die beobachtete S-Thiolierung auf Apo-Fe/S-Proteinen einführen könnten. Am naheliegendsten für die Ausführung dieser Aufgabe erscheinen in der Hefe Cystein Desulfurasen sowie Rhodanesen. Desulfurasen können ein Persulfid entweder direkt auf Akzeptor-Proteine übertragen (z.B. ISC-, SUF- oder NIF-Maschinerie), oder es für diverse Biosynthese-Stoffwechselwege bereitstellen (Mueller, 2006). Rhodanesen hingegen sind Sulfurtransferasen, die vor allem an der Entgiftung von cyanidhaltigen Verbindungen beteiligt sind (Cipollone et al, 2007).

Bei der Identifikation des verantwortlichen Enzyms für die Einführung der beobachteten S-Thiolierung auf Apo-Fe/S-Proteinen in den Mitochondrien der Hefe kam somit zunächst einmal eine in der ISC-Maschinerie bereits für die Maturierung von Isu1 genutzte Cystein Desulfurase in Frage: Nfs1. Nfs1 konvertiert mit Hilfe von Isd11 L-Cystein zu L-Alanin, wobei es das dabei frei werdende Schwefelatom zunächst transient kovalent in Form eines Persulfids bindet. Der gebundene Schwefel wird in einem Trans-Persulfurations-Folgeschritt katalytisch auf Isu1 übertragen, auf dem die *de novo*-Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters beginnt (Parent et al, 2015). Folglich lag die Vermutung nahe, dass Nfs1 ebenfalls die freien Cystein-SH-Gruppen von Apo-Fe/S-Zielproteinen erkennen, seinen als Persulfid gebundenen Schwefel übertragen und somit die Cysteinliganden chemisch vor direkter Oxidation schützen könnte. HiPIP-FLAG wurde daher in den Mitochondrien einer Gal-*NFS1*-Zelle exprimiert. Durch Wachstum in glucosehaltigem Minimalmedium wurde die Zelle für Nfs1 depletiert, die Mitochondrien im Anschluss isoliert und entsprechend Abbildung 1.4.3 mit MPB-11 modifiziert. Die Auftrennung der Proben im SDS-Gel und die Immundekoration der Nitrocellulosemembran mit anti-FLAG Antikörpern zeigte jedoch keine höheren Molekulargewichtsspezies HiPIP-FLAGs in der unter nativen Bedingungen modifizierten Probe (Abb. 1.5, A). Umgekehrt führte die Überexpression von Nfs1 in einer Gal-*ISA1*-Zelle nicht zu einer verminderten Zugänglichkeit der freien Cystein-SH-Gruppen HiPIPs in diesen Zellen (Abb. 1.5, A, ganz rechts). Folglich scheint Nfs1 nicht verantwortlich für die beobachtete Einführung der Cystein-S-Thiolierung von Apo-Fe/S-Zielproteinen zu sein.

Das Genom von *S. cerevisiae* kodiert für verschiedene Rhodanesen. Es wurden Deletionsstämme der mitochondrialen Rhodanesen Rdl1 und Rdl2 sowie der cytosolischen Rhodanese Tum1 generiert. Erneut wurde HiPIP-FLAG in diesen Zellen exprimiert, die Mitochondrien isoliert und gemäß Abbildung 1.4.3 mit MPB-11 modifiziert. In der SDS-PAGE ließen sich jedoch erneut keine höheren Molekulargewichtsspezies HiPIP-FLAGs weder im Wildtypstamm noch in einer Gal-*ARH1*-Zelle nachweisen, wenn zusätzlich in Form von Einzel- bis Trippelmutationen die genannten Rhodanesen

deletiert wurden (Abb. 1.5, A). Die beiden verbliebenen Rhodanesen Uba4 und Ych1 wurden nicht untersucht, da sie nicht mitochondrial lokalisiert sind. Folglich konnte ebenfalls kein Einfluss des Rhodanesesystems der Hefe bei der Einführung der beobachteten Cystein S-Thiolierung in mitochondriale Apo-Fe/S-Proteine nachgewiesen werden.

Eine weitere Schwefelquelle für das Auftreten von S-Thiolierungen von Cysteinseitenketten ist H_2S , welches in Eukaryoten in größeren Mengen vor allem von dem Sulfat-Assimilations-Stoffwechselweg freigesetzt wird (Hebert et al, 2013; Mishanina et al, 2015). Die unspezifische Freisetzung von Schwefelwasserstoff durch die Sulfit-Reduktase Met5 des Sulfat-Assimilations-Stoffwechselweges der Hefe könnte daher eventuell für die S-Thiolierung von mitochondrialen Apo-Fe/S-Proteinen verantwortlich sein. Zudem konnte gezeigt werden, dass die beiden Enzyme Cys3 und Cys4 des Cystein-Biosynthese-Stoffwechselweges in der Lage sind, sich auch als Sulfurtransferasen an der S-Thiolierung von diversen cytosolischen Proteinen und Metaboliten zu beteiligen (Ida et al, 2014). Es konnte des Weiteren beobachtet werden, dass es in *cys4Δ*-Zellen zu einer erhöhten Freisetzung von Schwefelwasserstoff durch eine verstärkte Aktivität von Met5 kommt (Linderholm et al, 2008).

Es wurden daher Deletionsstämme aller drei genannten Proteine generiert. *Met5Δ*-Zellen weisen eine strikte Methionin-Auxotrophie auf, wohingegen *cys3Δ* und *cys4Δ*-Zellen auf die Supplementation mit Cystein im Medium angewiesen sind. Die Deletionsstämme wurden auf die korrekte Deletion der entsprechenden Gene hin nicht nur per Kolonie-PCR, sondern auch mit Hilfe eines Tüpfeltests auf Hartagarplatten ohne Cystein- und Methionin-Supplementation getestet. Hierzu wurde eine kleine Fraktion einer Über-Nacht-Kultur sequentiell 1:10 verdünnt, auf die unterschiedlich supplementierten Hartagarplatten getüpfelt und bei 30 °C für drei Tage inkubiert. Die Deletionsstämme wiesen den oben beschriebenen Phänotyp auf (Abb. 2.5, C). Wurden Mitochondrien aus diesen Deletionsstämmen, die zusätzlich HiPIP exprimierten und in Minimalmedium angezogen worden waren, mit MPB-11 gemäß Abbildung 1.4.3 modifiziert, so konnten keine höheren Molekulargewichtsspezies HiPIPs in der SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 1.5, B).

Die Ergebnisse der Maleimidmodifikation HiPIPs in den Delta-Stämmen des Sulfat-Assimilations- und Cystein-Stoffwechselweges sind jedoch noch nicht überzeugend. Wurden die Zellen, ersichtlich in Abbildung 1.5, B, C, in Flüssigkultur in Minimalmedium supplementiert mit allen Aminosäuren, insbesondere mit 80 mg/l Methion und 10 mg/l Cystein angezogen, so zeigten sie einen starken Wachstumsdefekt. Die zusätzliche Depletion einer ISC-Komponente wäre nötig, um größere Mengen an Apo-Fe/S-Proteinen in den Delta-Stämmen zu akkumulieren und um folglich eine Aussage über die Zugänglichkeit der Cysteinseitenketten von Apo-Fe/S-Proteinen in diesen Zellen treffen zu können.

Auf Grund des starken Wachstumsdefekts der in Abbildung 1.5, B, C gezeigten Zellen in Minimalmedium ließ sich dieses Experiment jedoch nicht ausführen.

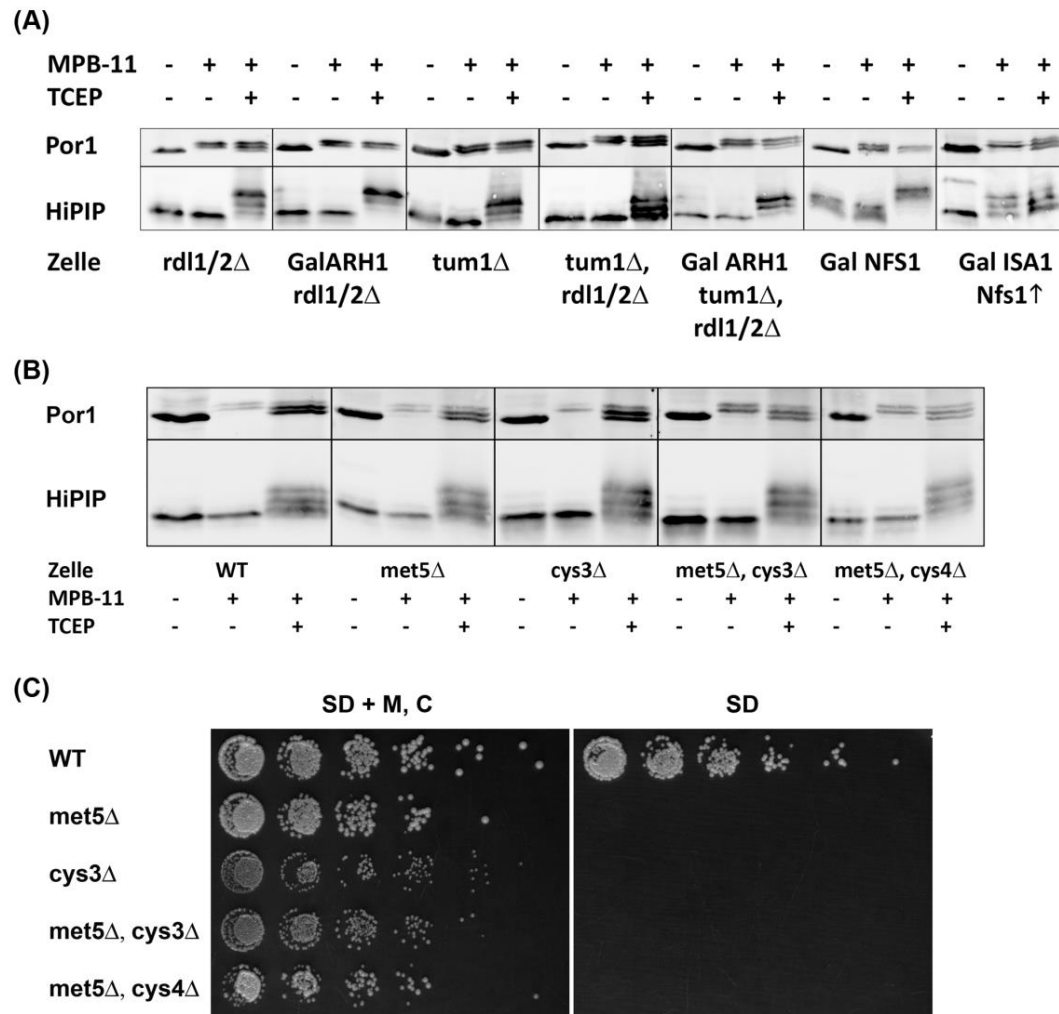


Abbildung 1.5 Die Cystein Desulfurase Nfs1 und die Rhodanesen Rdl1, Rdl2 und Tum1 sind nicht beteiligt an der Cystein-S-Polythiolierung von HiPIP. (A, B) Hefestämme mit Deletionen in den angezeigten Genen exprimierten eine FLAG- (A) bzw. eine Myc-getaggte (B) Version des bakteriellen [4Fe-4S]-Proteins HiPIP aus *A. vinosum* in ihren Mitochondrien und wurden gemäß Abbildung 1.4.3 mit MPB-11 modifiziert. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE separiert und HiPIP-FLAG/HiPIP-Myc im Western-Blot durch Immundekoration mit α -FLAG/ α -Myc-Antikörpern sichtbar gemacht. In einem Gal/ISA1-Stamm wurde Nfs1 (Nfs1↑) von einem Plasmid koexprimiert. (C) Eine kleine Fraktion einer Über-Nacht-Kultur der Hefestämme aus (B) wurde seriell 1:10 verdünnt, auf Hartagarplatten getüpfelt und bei 30 °C für drei Tage inkubiert. Die glucosehaltigen Minimalmediumplatten waren unterschiedlich supplementiert mit und ohne die Aminosäuren Methionin und Cystein.

Etablierung eines Split-Luciferase-Testsystems für Studien der Protein-Protein-Interaktion mitochondrialer Proteine

2.1 Hintergrund

Mitochondrien sind das Drehkreuz für Metabolite nahezu aller Stoffwechselwege in Eukaryoten. Für diese Aufgabe beherbergen sie zahlreiche, teils äußerst komplex zusammengesetzte Proteinmaschinerien. Die Entschlüsselung der beteiligten Interaktionspartner und die Charakterisierung des zu Grunde liegenden molekularen Mechanismus dieser Maschinerien sind von großem Interesse. Bezüglich der Mitochondrien von Eukaryoten gibt es jedoch bis heute einen Mangel an überzeugenden Systemen für die systematische Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde daher ein Split-Luciferase-Testsystem in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* etabliert und für Protein-Protein-Interaktionsstudien genutzt. Dieses Testsystem gehört zu den sogenannten „Protein-Fragment-Komplementations-Systemen“ (protein-fragment complementation assays (PCA)) und beruht auf dem Prinzip der Re-Assemblierung zweier inaktiver Hälften eines artifiziell in zwei Domänen geteilten Enzyms. Durch die Fusion jeweils einer Domäne des Enzyms an zwei unterschiedliche Interaktionspartner werden diese erneut in enge räumliche Nähe zueinander gebracht und die enzymatische Aktivität des Enzyms wiederhergestellt (Hida et al, 2009; Magliery et al, 2005; Michnick et al, 2007).

Eukaryoten besitzen eine mitochondriale Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierungsmaschinerie, das sogenannte ISC- (iron sulfur cluster) System. Bis heute konnten viele Komponenten dieser Maschinerie identifiziert und deren Zusammenspiel funktionell charakterisiert werden. Die meisten dieser Arbeiten beschränken sich jedoch auf die Kern-ISC-Maschinerie, also all jene Komponenten, die letztlich für die *de novo* Biogenese eines [2Fe-2S]-Clusters auf dem Gerüstprotein Isu1 verantwortlich sind. Verglichen damit ist das Wissen über die späten ISC-Faktoren, welche für die Konversion des [2Fe-2S]-Clusters von Isu1 in einen [4Fe-4S]-Cluster auf Fe/S-Zielproteinen verantwortlich ist, sehr gering. Es ist weder der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus noch die Summe aller beteiligten Interaktionspartner bekannt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher versucht ein experimentelles Testsystem zu entwickeln, was erlaubt, die Protein-Protein-Wechselwirkungen der bekannten Komponenten der späten ISC-Maschinerie in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* systematisch zu charakterisieren.

2.2 Das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem

Im Laboralltag finden verschiedene Luciferasen als rekombinante Biosensoren Verwendung. Die in dieser Arbeit verwendete Luciferase stammt aus der Oktokoralle *Renilla reniformis* (Matthews et al, 1977). *Renilla Reniformis* kann vor den Küsten North Carolinas bis Florida sowie vor Brasilien gefunden werden. Die *Renilla*-Luciferase (hRluc) zählt zu den kleinsten derzeit im Labor genutzten Luciferasen. Sie setzt das Substrat Coelenterazin unter Verbrauch von Sauerstoff und Abspaltung von Kohlendioxid zu Coelenteramid um. Beim Rückfall der Elektronen auf den Grundzustand setzt das Produkt elektromagnetische Strahlung im blauen Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtspektrums frei (Lorenz et al, 1991; Thorne et al, 2010). Dieser Vorgang, bei dem durch eine chemische Reaktion elektromagnetische Strahlung im Bereich des ultravioletten bis infraroten Bereichs des Lichts emittiert wird, bezeichnet man als Chemilumineszenz.

Die *Renilla*-Luciferase ist ein 36 kDa großes Enzym, welches funktionell aus zwei Domänen besteht, einer N-terminalen α/β -Hydrolasen-Domäne von ca. 25 kDa und einer kleineren C-terminalen Kappen-Domäne von ca. 9 kDa (Abb. 2.2. A, B). Die kleinere Domäne bildet eine Art Deckel, welcher sich über der Bindetasche nach Anlagerung des Substrates schließt. Die katalytisch wichtigen Aminosäuren bestehen vermutlich aus der Triade D120/E144/H285 und sind auf die beiden Domänen verteilt (Loening et al, 2007; Woo et al, 2008). Ein ähnlicher molekularer Aufbau findet sich auch bei der Luciferase des Leuchtkäfers (Conti et al, 1996). Es konnte in verschiedenen Organismen gezeigt werden, dass sich die *Renilla*-Luciferase an Position 229 und 230 in zwei stabil vorliegende Hauptdomänen des Enzyms trennen (Abb. 2.2, C) und über einen flexiblen (GGGS)₂-Linker C-terminal an verschiedene Zielproteine fusionieren lässt (Fujikawa & Kato, 2007; Paulmurugan & Gambhir, 2003). Jede Domäne ist für sich enzymatisch inaktiv; bringt man sie jedoch in enge räumliche Nähe durch die Fusion jeweils einer Domäne an einen von zwei Bindungspartnern, so lässt sich die enzymatische Aktivität der Luciferase partiell wiederherstellen. Grund hierfür ist vermutlich neben der offensichtlichen Zweiteilung des Enzyms, dass sich durch die künstliche Spaltung des Proteins das Histidin 285 der katalytischen Triade in der C-terminalen Domäne wiederfindet, wohingegen die beiden anderen katalytisch entscheidenden Aminosäuren in der N-terminalen Domäne lokalisiert sind (Abb. 2.2, D).

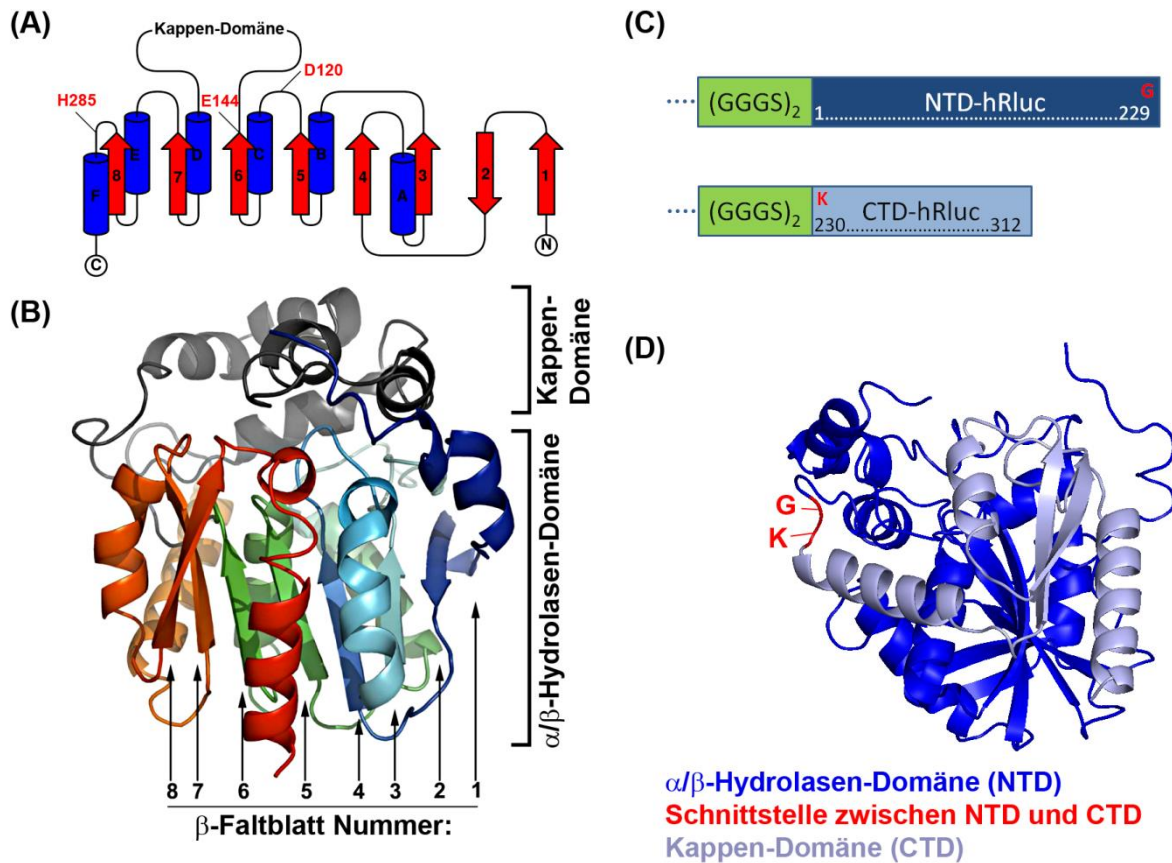


Abbildung 2.2 Die Luciferase aus *Renilla reniformis* lässt sich in zwei funktionelle Domänen trennen. **(A)** Schematische Darstellung der Tertiärstruktur der Luciferase aus *Renilla Reniformis* mit vielen β -Faltblatt-Strukturen (rot) und α -Helices (blau). Die Nummerierung/Buchstaben wurden entsprechend dem Standard für α/β -Hydrolasen vorgenommen. In Rot sind zudem die Positionen von drei, vermutlich das katalytische Zentrum des Enzyms formenden, Aminosäuren angezeigt. **(B)** Lage und Struktur der Kappen- und der α/β -Hydrolasen-Domäne auf Grundlage einer Röntgenkristallographieanalyse bei einer Auflösung von 1,4 Angström. **(C, D)** Darstellung der im Rahmen dieser Dissertation eingeführten Schnittstelle zwischen Aminosäureposition 229 und 230 (rote Markierung) der *Renilla* Luciferase in schematischer Form **(C)** und als modifizierte Kristallstruktur **(D)**. Die aus dieser Spaltung resultierende N-terminale Domäne (NTD) und eine kleinere C-terminale Domäne (CTD) sind farblich kodiert in Dunkel- und Hellblau indiziert. Mit Hilfe eines flexiblen (GGGS)₂-Linkers (grüne Markierung, C) wurden die Domänen C-terminal an verschiedene Zielproteine fusioniert. Alle Abbildungen wurden erstellt oder entnommen und nachträglich modifiziert nach PDB-ID: 2PSF (Loening et al, 2007)).

2.3 Plasmide zur Herstellung von Fusionsproteinen für ein Split-Luciferase-Testsystem

Im Rahmen dieser Dissertation wurde versucht, ein Split-Luciferase-Testsystem für die Nutzung in Mitochondrien von *S. cerevisiae* zu entwickeln. Zum Startzeitpunkt des Projekts gab es lediglich eine in der Literatur beschriebene Anwendung eines solchen Testsystems für Mitochondrien. In dieser Veröffentlichung wurden zwei Domänen der *Renilla* Luciferase jeweils über große Leucin-Zipper-Domänen an verschiedene mitochondriale Proteine in humanen Zellen fusioniert und deren Interaktionsverhalten in den Mitochondrien analysiert (Huang et al, 2010). Die Verwendung eines Protein-Fragment-Komplementations-Systems ist potentiell artefaktbelastet. Wie in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, neigen Analysesysteme wie das Split-GFP- oder das Split-Luciferase-Testsystem dazu, mitunter sehr sensitiv auf Expressionsunterschiede in den untersuchten Bindungspartnern sowie auf geänderte pH-, Salz-, oder Temperaturbedingungen zu reagieren (Abad et al, 2004). Dies kann zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen in einer Protein-Protein-Interaktionsstudie führen. Dies gilt insbesondere auch, wenn zusätzlich noch große Linkerdomänen zwischen das Zielprotein und die Luciferasedomäne wie im oben beschriebenen Beispiel eingeführt werden, welche zu einer Autoassemblierung neigen. Zur Minimierung dieser Probleme erlaubt das hier im Weiteren vorgestellte mitochondriale Split-Luciferase-Testsystem eine direkte Fusion der Luciferasedomänen an mitochondriale Zielproteine in der Hefe. Zusätzlich erfolgt diese Fusion unter Erhalt des endogenen Promotors des manipulierten Gens. Mit diesem System sollte sich folglich erstmalig eine physiologische Aussage zum Interaktionsverhalten mitochondrialer Proteine in der Bäckerhefe auf Grundlage eines Split-Luciferase-Testsystems treffen lassen.

Die direkte Fusion der hRluc-Domäne an mitochondriale Zielproteine wurde durch die Verwendung eines kurzen, flexiblen (GGGS)₂-Linkers ermöglicht. Die genomische Integration der Luciferasedomänen und die C-terminale Fusion an mitochondriale Gene erfolgte durch somatische Rekombination in *S. cerevisiae*. Als Grundlage für die Generierung der Split-Konstrukte wurde auf die Veröffentlichung von Paulmurugan et al. zurückgegriffen (Paulmurugan & Gambhir, 2003). Als Ausgangsvektor für die eigene Klonierung diente der pGL4.70[hRluc]-Vektor (E688A, Promega Corporation, Fitchburg, USA). Das hier etablierte Testsystem besteht aus den drei Vektoren pUG73 NTD-hRluc, pFA6a-kanMX4 NTD-hRluc sowie pUG72 CTD-hRluc (siehe Material und Methoden, Abb. 4.3.1). Alle drei Vektoren kodieren (in 5'-3'-Richtung, kodierender Strang) für einen (GGGS)₂-Linker, sequenziell gefolgt von der NTD- oder CTD-hRluc-Domäne, einem CYC-Terminator und einem Selektionsmarker (Abb. 2.3.1, A), der durch das Plasmidrückgrat definiert wird: pUG73 (LEU2), pFA6a-kanMX4 (Geneticin, G418) und pUG72 (URA3). Um ein endogenes Fusionskonstrukt aus einer *Renilla*-Luciferase-Domäne und einem mitochondrialen Gen zu erzeugen, muss zunächst ein PCR-Produkt generiert werden, welches alle oben genannten Elemente der

Ausgangsplasmide als Kasette amplifiziert und sich in *S. cerevisiae* transformieren lässt (Abb. 2.3.1, A).

Hierzu benötigt man ein vorwärts- und ein rückwärts gerichtetes Oligonukleotidpaar mit 20 Basenpaaren (bp) Länge, komplementär zum 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs auf den drei Ausgangsvektoren. Das vorwärts gerichtete Oligonukleotid am 5'-Ende (L1) wurde so gewählt, dass es direkt am universell vorhandenen (GGGS)₂-Linker bindet (Abb. 2.3.1, A). Somit wird nur ein vorwärts gerichtetes Oligonukleotid für alle Plasmide dieses Split-Luciferase-Testsystems benötigt und ein jeweils spezifisches rückwärts gerichtetes. Abbildung 2.3.1, B listet die DNA-Sequenzen der zugehörigen Oligonukleotide L1 bis L4.

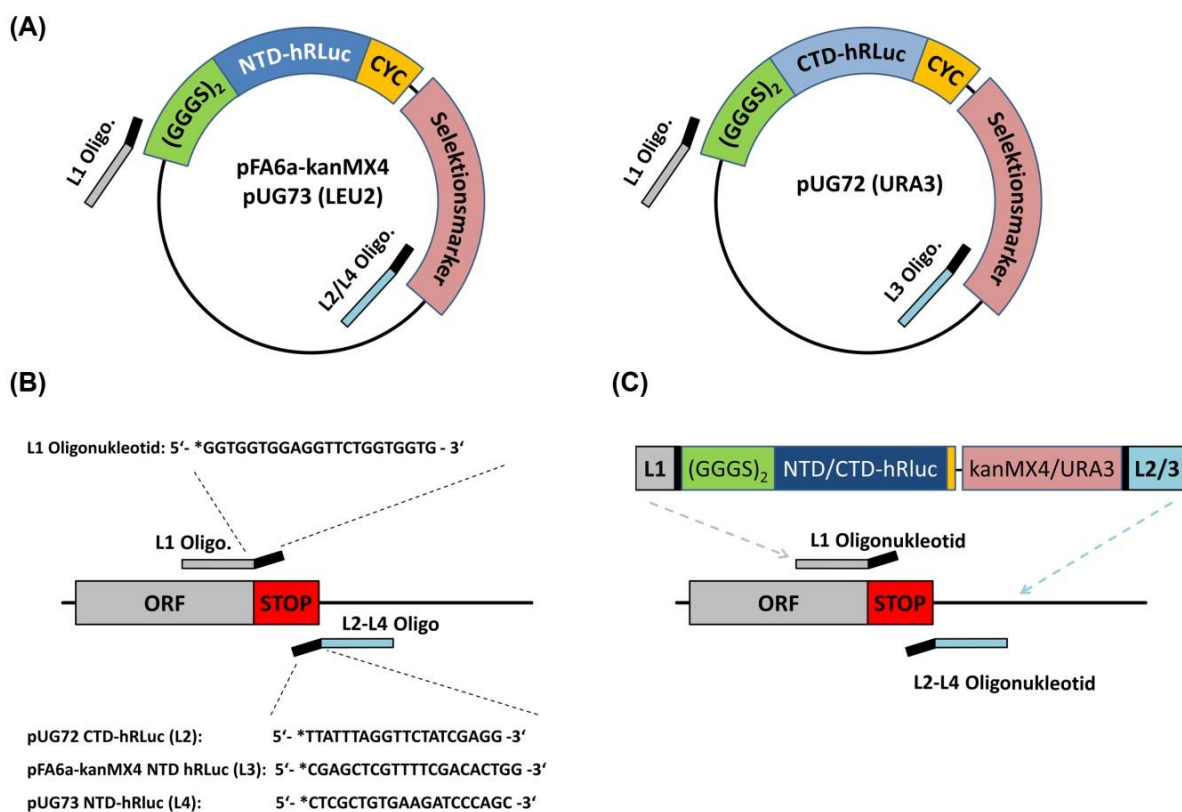


Abbildung 2.3.1 Prinzip der PCR-basierten C-terminalen Fusion der Einzeldomänen des in dieser Arbeit beschriebenen Split-Luciferase-Testsystems an mitochondriale Zielgene durch somatische Rekombination in *S. cerevisiae*. (A) Schematische Darstellung der PCR-basierten Manipulation von Hefestämmen. Die hier verwendeten Plasmide für eine genomische Integration und Fusion einer hRLuc-Domäne an ein mitochondriales Gen kodieren für eine DNA-Kasette, bestehend aus einem Selektionsmarker und entweder der NTD- oder der CTD-hRLuc. Die beiden Kassetten kodieren am 5'-Ende zusätzlich für einen (GGGS)₂-Linker und am 3'-Ende für einen CYC-Terminator. Das Oligonukleotid L1 in Kombination mit dem Oligonukleotid L2, L3 oder L4 erlaubt die jeweilige PCR-basierte Amplifikation der gesamten Kasette und ihre zielgerichtete Integration in das Genom mittels somatischer Rekombination in *S. cerevisiae* (B, C). Hierbei vermittelt ein 20 Basenpaar langer Bereich der Oligonukleotide die Anlagerung auf dem jeweiligen Plasmid und ein 45-55 Basenpaar langer Überhang definiert den Ort der Integration des PCR-Produkts im Hefegenom. Der Basenpaarüberhang des L1-Oligonukleotids ist im 3'-Ende eines ORFs (offener Leserahmen) unmittelbar in der kodierenden Sequenz vor

dem Stop-Kodon zu wählen, gefolgt von der DNA-Sequenz 5'- GGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'. Der Basenpaarüberhang der Oligonukleotide L2-L4 sollte entweder unmittelbar strangabwärts des Stop-Kodons oder in kurzer Distanz im 3'-UTR (untranslatierte Region) ausgesucht werden und revers komplementär gefolgt werden von den DNA-Sequenzen: 5'-CGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3' (L2), 5'- TTATTAGGTTCTATCGAGG -3' (L3) oder 5'- CTCGCTGTGAAGATCCCAGC -3' (L4). Die Kombination der Oligonukleotide L1/L2 liefert ein NTD-hRluc Konstrukt mit dem Selektionsmarker kanMX, die Kombination L1/L3 ein CTD-hRluc-Konstrukt mit dem Selektionsmarker URA3 und die Kombination L1/L4 ergibt schließlich ein NTD-hRluc-Konstrukt mit dem Selektionsmarker LEU2.

Für die genomische Integration und Fusion der PCR-generierten DNA-Kassetten mit mitochondrialen Genen in *S. cerevisiae* muss der Anwender einen 5'- und einen 3'-Basenpaarüberhang von 45-55 Basenpaaren (bp) definieren (Details zur Synthese von entsprechenden Oligonukleotiden siehe Legende Abbildung 2.3.1). Ein ähnliches methodisches Vorgehen für die stabile Transformation von Hefen wurde bereits anderweitig beschrieben (Janke et al, 2004). Eine Liste aller DNA-Sequenzen der fertigen Oligonukleotide für die in dieser Arbeit untersuchten mitochondrialen Gene ist dem Material- und Methodenteil dieser Arbeit, Kapitel 4.4.2, zu entnehmen. Da die fertigen Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation der DNA-Kassetten eine Länge von jeweils ca. 80 bp und somit Schmelztemperaturen von mitunter mehr als 90 °C aufweisen, wurde ein universelles PCR-Programm entwickelt, um schnell und reproduzierbar DNA-Matrizen für eine Hefetransformation zu generieren. Für Details siehe Kapitel 4.6.1.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zudem Vektoren für ein Plasmid-basiertes Split-Luciferase-Expressionssystem generiert. Dieses sollte die Überexpression von Fusionsproteinen mit einer Luciferasedomäne von 42x-2µ Plasmiden unter Kontrolle eines TDH3-Promotors und eines CYC1-Terminators in Hefe ermöglichen. Hierzu wurden Hefe-Expressionsvektoren mit PCR-basierten Methoden modifiziert (Funk et al, 2002). Das bestehende System erlaubt die Überexpression eines beliebigen Zielproteins in *S. cerevisiae*, welches C-terminal über einen (GGGS)₂-Linker an eine Luciferasedomäne fusioniert wird. Hierzu muss das entsprechende Gen mit PCR-basierten Methoden zunächst amplifiziert und am 5'- und 3'-Ende mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen werden, welche im Anschluss eine Ligation des PCR-Produkts in die Multiple Klonierungsstelle eines der Vektoren in Abbildung 4.3.2 (siehe Material und Methoden) erlaubt. Der unterste Expressionsvektor in Abbildung 4.3.2 kodiert zusätzlich für eine F1β Zielsequenz vor der N-terminalen-hRluc-Domäne und erlaubt somit das fertige Fusionsprotein in die Mitochondrien der Bäckerhefe zu dirigieren. Mit dem weiter oben beschriebenen Split-Luciferase-Testsystem zur Integration der hRluc-Domänen in das Hefegenom lassen sich Protein-Protein-Interaktionen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* unter Erhalt des physiologischen Expressionslevels der untersuchten Proteine analysieren. Das hier beschriebene 42x 2µ-Plasmid-basierte Split-Luciferase-Testsystem

hingegen eignet sich zur Überexpression eines oder mehrerer Fusionsproteine in *S. cerevisiae*. Dies stellt eine unphysiologische Bedingung dar, und daher wurde diese Methode im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht genutzt. Es könnte jedoch für andere Fragestellungen Verwendung finden, in denen zum Beispiel äußerst niedrig abundante Proteine in der Zelle einer Interaktionsstudie mit Hilfe der Split-Luciferase-Technik zugänglich gemacht werden sollen.

2.4 Charakterisierung des Split-hRluc-Systems

Die späte ISC-Maschinerie ist auf die Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters in einen [4Fe-4S]-Cluster und den Transfer dieses Fe/S-Clusters auf Ziel-Proteine spezialisiert. Die entscheidenden zentralen Komponenten der späten ISC-Maschinerie, Isa1, Isa2 und Iba57, interagieren nachweislich miteinander und sind essentiell beteiligt an der Maturierung aller bekannten mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteine (Gelling et al, 2008). Über ihr eventuell dynamisches Zusammenspiel und ihre mechanistische Wirkungsweise ist jedoch noch nicht viel bekannt. In einem ersten Experiment sollten nun diese drei Proteine dazu genutzt werden, dass in dieser Arbeit vorgestellte *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem für die Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* zu etablieren. Hierzu wurden im Genom der Bäckerhefe DNA-Kassetten, kodierend für jeweils eine CTD- oder eine NTD-hRLuc-Domäne und einen Selektionsmarker, an die drei Gene ISA1, ISA2 und IBA57 mit Hilfe PCR-basierter Methoden (siehe oben) und somatischer Rekombination fusioniert. Nach erfolgreicher Selektion der Transformanten wurden die Zellen auf Luciferaseaktivität hin untersucht. Hierzu wurden die Stämme [ISA1CTD, ISA2NTD] und [ISA1NTD, IBA57CTD] in voll supplementiertem Minimalmedium über Nacht angezogen, auf ein OD = 0,2 verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase weiterkultiviert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität im Lysat der Zellen mit einem Flash-Testverfahren in einem sensitiven Einzel-Röhren-Chemiluminometer mit Autoinjektionssystem gemessen (SiriusL, Titertek Berthold).

Bei der Messung der Luciferaseaktivität wird zwischen dem sogenannten Glüh- und dem Flash-Testverfahren unterschieden. Die Luciferase setzt ihr Substrat nach einer kurzen „Burst-Phase“, in der zunächst keine und dann kurzzeitig das Maximum der messbaren Lichtintensität gemessen werden kann, in einer kinetischen Reaktion erster Ordnung um (DeLuca & McElroy, 1974). Der lineare Anteil der Kinetik beträgt je nach verwendeter Luciferase ca. 40-60 % der Luciferasereaktion und wird im Glühtestverfahren detektiert. Die Kinetik der katalytischen Reaktion in den Glühtestverfahren wird durch die Zugabe eines alternativen Substrates künstlich verlangsamt, wodurch lichtschwächere, aber über die Zeit stabilere Chemilumineszenzsignale zu detektieren sind (Promega, 2011; Sundquist, 2011). Das Flash-Testverfahren nutzt die Tatsache aus, dass die *Renilla*-

Luciferase unmittelbar nach Umsetzung ihres nativen Substrates Coelenterazin und Generierung des Chemilumineszenzsignals spontan in einen inaktiven Zustand übergeht. Dies führt zu einer charakteristischen „Flash“-Kinetik mit einem kurzen, äußerst starken Lichtsignal unmittelbar nach Zugabe des Coelenterazins (Promega, 2011; Sundquist, 2011). Das Flash-Testverfahren lieferte in der vorliegenden Arbeit mit der *Renilla* Split-Luciferase einen starken Lichtblitz ungefähr 0,2 bis 0,4 ms nach Zugabe des Substrats zur Probe. Für dieses Testverfahren gilt grundsätzlich, dass die Verstärkung des Chemilumineszenzsignals durch die Detektion des Lichtblitzes im Flash-Test proportional zu der Luciferaseaktivität in der Probe ist (Sundquist, 2011).

Die Stämme [ISA1CTD, ISA2NTD] und [ISA1NTD, IBA57CTD] wurden wie oben beschrieben angezogen und mit dem Flash-Testverfahren gemessen. Wie aus Abbildung 2.4.1, A ersichtlich, ließ sich mit dieser Technik eine robuste Luciferaseaktivität in den beiden Zellen detektieren, was auf eine physikalische Interaktion der jeweiligen Fusionsproteine hindeutet. Da bekannt ist, dass diese Proteine *in vivo* miteinander interagieren, entspricht dieses Ergebnis der Erwartungshaltung. Auch ein Vertauschen der Domänen an den Proteinen Iba57 und Isa1 wurde erfolgreich durchgeführt. Die Absolutwerte der ermittelten Luciferaseaktivität der [ISA1NTD, IBA57CTD]- bzw. [IBA57NTD, ISA1CTD]-Zellen waren zwar unterschiedlich, aber grundsätzlich ließ sich ein Domänen austausch für diese beiden Proteine problemlos ausführen.

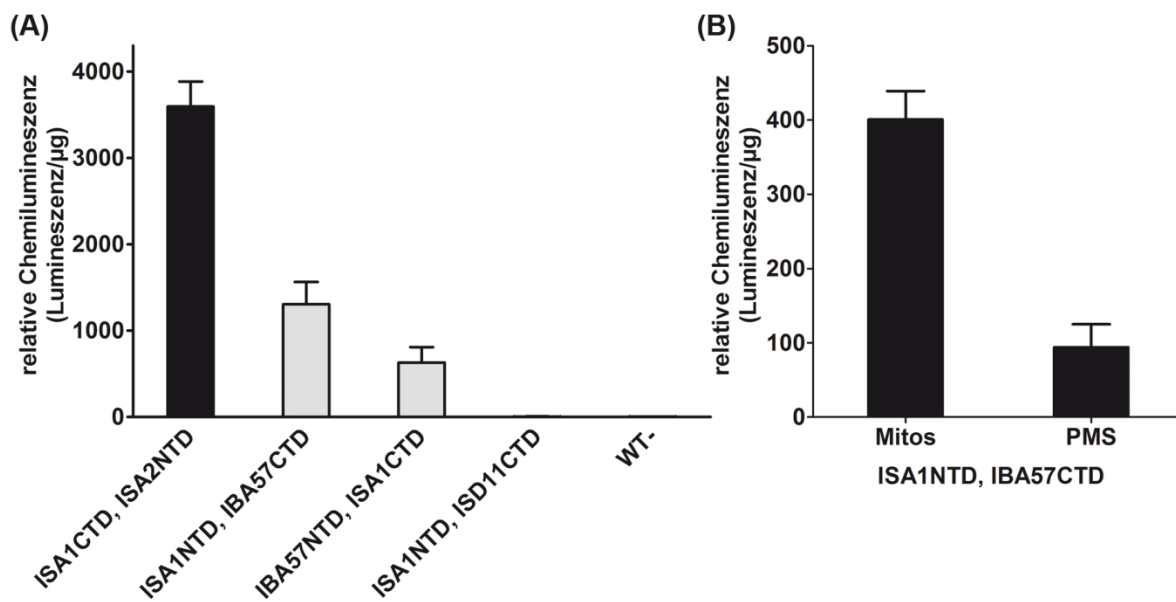


Abbildung 2.4.1 Nachweis der Interaktion von *Isa1*, *Isa2* und *Iba57* in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* mittels eines Split-Luciferase Testsystems. Wildtyp-Hefezellen wurden mit DNA-Kassetten transformiert, welche eine genomische Fusion jeweils einer der hRluc-Domänen an die indizierten Zielgene erlaubte. Im Anschluss wurden Einzelklone selektiert. Zum Beispiel wurde somit in der [ISA1CTD, ISA2NTD]-Zelle ISA1 am 3'-Ende des ORFs mit der CTD-hRluc fusioniert und ISA2 entsprechend mit der NTD-hRluc. **(A)** Die angegebenen Hefestämme wurden für 16 h in Minimalmedium angezogen, auf eine OD = 0,2 verdünnt und für weitere 5 h bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase weiterkultiviert. Zelllysate wurden hergestellt und die Luciferaseaktivität bestimmt. **(B)** [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen wurden in eine mitochondriale und in eine cytosolische Fraktion (PMS) aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität in den beiden Teilfraktionen.

Als negative Kontrolle wurde der Stamm [ISA1NTD, ISD11CTD] hergestellt. Isd11 ist eine Komponente der Kern-ISC-Maschinerie und daher war keine Interaktion mit *Isa1* zu erwarten gewesen. In der Tat entsprach die Luciferaseaktivität in [ISA1NTD, ISD11CTD]-Zellen dem Hintergrundsignal einer Wildtypzelle ohne Luciferase (WT-, Abb. 2.4.1, A).

Diese Daten zeigen, dass sich mit dem *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem bekannte Protein-Protein-Interaktionen in Mitochondrien bestätigen lassen. Als nächstes blieb zu klären, ob die genomische Fusion mit einer der hRluc-Domänen die Lokalisation der Fusionsproteine beeinflusste. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen in Vollmedium angezogen, die Mitochondrien isoliert (siehe Kapitel 4.6.3) und eine Probe des post-mitochondrialen Überstandes genommen, welcher prinzipiell eine Fraktion der cytosolischen Proteine darstellt. In beiden Proben erfolgte die Messung der *Renilla*-Luciferaseaktivität mit Hilfe des oben beschriebenen Biochemilumineszenz-Verfahrens. Abbildung 2.4.1, B zeigt ein deutlich stärkeres

Chemilumineszenzsignal für die mitochondriale Fraktion. Folglich scheint die Fusion der beiden Proteine mit jeweils einer der hRluc-Domänen ihre zelluläre Lokalisation nicht zu beeinflussen.

Neben der Lokalisation kann das Anhängen eines Tags an ein Protein auch seine Funktion beeinträchtigen. Um abzuklären, inwieweit die Fusion mit einer Luciferasedomäne die Funktion von Isa1, Isa2 und Iba57 beeinträchtigte, wurden [ISA1CTD, ISA2NTD]- sowie [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen mit verschiedenen Testverfahren auf ihre Vitalität hin überprüft. Es ist bekannt, dass die Deletion von ISA1, ISA2 oder IBA57 zu einer Auxotrophie für Lysin und Glutamat sowie zu einem Verlust der mitochondrialen DNA führen (Gelling et al, 2008). Folglich sollten die oben genannten Hefestämme nicht auf einer Minimalmediumplatte ohne Lysin und Glutamat anwachsen können, sofern die Fusion mit einer der Luciferasedomänen die Funktion der genannten ISC-Gene beeinflusste. Die genannten hRluc-Stämme wurden zusammen mit dem Wildtypstamm W303-1A auf Hartagarplatten mit den bzw. ohne die Aminosäuren Lysin und Glutamat getüpfelt sowie zusätzlich supplementiert mit Glucose oder Galactose als alternative Kohlenstoffquelle für ihren Metabolismus. Abbildung 2.4.2, A zeigt keine Wachstumsunterschiede zwischen den Zellen unter den getesteten Bedingungen. Auch bei der Verwendung einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle (Glycerin) zeigte sich kein Wachstumsdefekt. Man kann also davon ausgehen, dass die gezeigten ISC-Proteine nicht durch die Fusion mit einer der Luciferasedomänen in ihrer Funktion gestört wurden. Ein ähnliches Bild offenbarte sich bei der Analyse verschiedener Enzymaktivitäten in den Lysaten dieser Zellen (Abb. 2.4.2, B, C). Die Aconitase (Aco1) ist ein mitochondriales [4Fe-4S]-Enzym, welches für die eigene Maturierung auf Isa1, Isa2 und Iba57 angewiesen ist (Gelling et al, 2008; Muhlenhoff et al, 2011). Die Aconitase zeigte jedoch in [ISA1CTD, ISA2NTD]- sowie in [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen eine enzymatische Aktivität auf Wildtyp-Niveau. Die Enzymaktivität der Cytochrome-c-Oxidase (Cox) in den gleichen Zellen war ebenfalls auf Wildtyp-Niveau (Abb. 2.4.2, C). Eine Cox-Defizienz kann in *iba57Δ*-Zellen (Chen et al, 2007; Gelling et al, 2008) und in Zellen mit Defekten in der Kern-ISC-Maschinerie (Barros et al, 2002; Moraes et al, 2004) beobachtet werden. Die Analyse der Aktivitäten beider Enzyme veranschaulicht, dass die Fusion der drei untersuchten ISC-Proteine mit einer der hRluc-Domänen zu keiner messbaren Veränderung der Physiologie der Zellen führte.

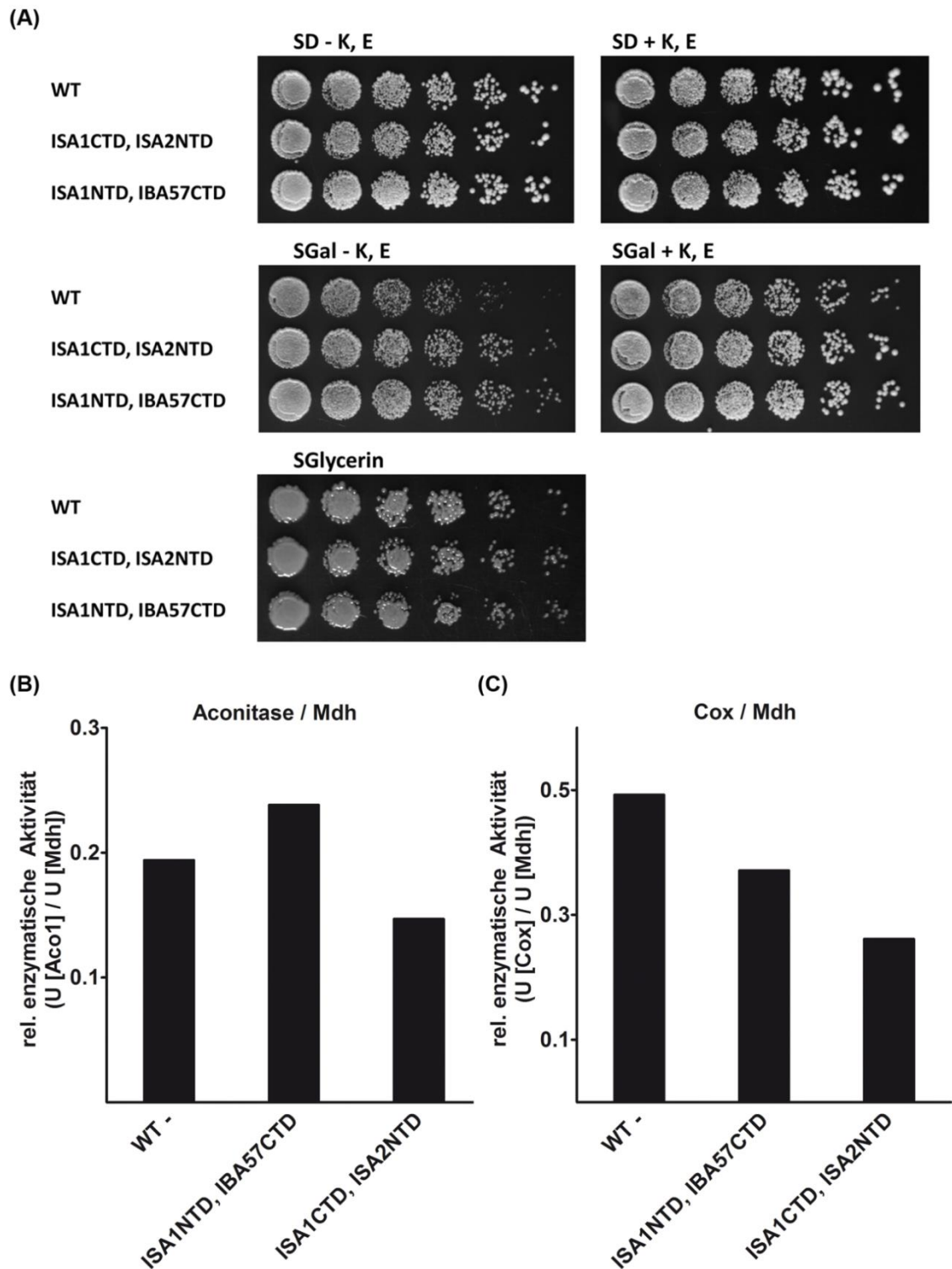


Abbildung 2.4.2 Die Fusion mit einer NTD- oder CTD-hRluc beeinträchtigt nicht die Funktion von *Isa1*, *Isa2* und *Iba57* in *S. cerevisiae*. (A) [ISA1CTD, ISA2NTD]- und [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen wurden über Nacht in Vollmedium angezogen. Eine kleine Fraktion dieser Über-Nacht-Kultur wurde im Anschluss seriell 1:10 verdünnt, auf unterschiedlich supplementierte Hartagarplatten getüpfelt und bei 30 °C für zwei Tage inkubiert. (B, C) Die enzymatische Aktivität des [4Fe-4S]-Proteins Aconitase (Aco1) und des Häm-haltigen Enzyms Cytochrome-c-Oxidase (Cox) wurde im Lysat der Zellen aus (A) bestimmt und auf die Enzymaktivität der Malatdehydrogenase (Mdh) normalisiert.

Im Verlauf der Etablierung des *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems zeigte es sich, dass die Signalintensität und Reproduzierbarkeit der Messwerte der Luciferaseaktivität am höchsten waren, wenn die Hefezellen in glucosehaltigem Minimalmedium angezogen wurden und sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin stellte sich heraus, dass die Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin zum Lysepuffer des “*Renilla*-Juice Luciferase Assay”-Kits der Firma PJK GmbH, Kleinblittersdorf, zu einer Steigerung der messbaren Enzymaktivität führte (Daten nicht gezeigt). Diese Bedingungen wurden daher auch als Standard für alle Folgeexperimente gewählt.

Eine direkte Messung der Luciferaseaktivität in nicht lysierten Zellen *in vivo* mit Hilfe des membrangängigen Substrates Viviren der Firma Promega Corporation, Fitchburg, USA (Molik et al, 2007) scheiterte an der technischen Nachweisgrenze des Chemilumineszenzsignals der *Renilla* Split-Luciferase. Diese Beobachtung konnte ebenfalls anderweitig gemacht werden (Huang et al, 2010).

2.5 Dynamik des trimeren Komplexes aus Isa1, Isa2 und Iba57

Mit Hilfe des *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems konnten somit die bekannten Interaktionen zwischen den ISC-Proteinen Isa1, Isa2 und Iba57 auf endogenem, physiologischem Expressionslevel bestätigt werden. Durch die Fusion jeweils eines der Gene an eine der Luciferasedomänen wurde die *Renilla* Luciferaseaktivität in den Zellen [ISA1CTD, ISA2NTD] oder [ISA1NTD, IBA57CTD] wiederhergestellt (Abb. 2.4.1, A). Die Daten der genannten Zellen legten das Vorhandensein eines trimeren Komplexes der drei Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 *in vivo* nahe. Um dies zu zeigen, sollten nun die binären Interaktionen zwischen zum einen Isa1CTD und Isa2NTD und zum anderen Isa1NTD und Iba57CTD durch Entfernen des dritten Partners gestört werden. Hierzu wurden in den Zellen [ISA1CTD, ISA2NTD] oder [ISA1NTD, IBA57CTD] der Promotor des jeweils dritten ISC-Gens des Komplexes gegen den *Gal-1-10* oder den *Gall*-Promotor ausgetauscht (Mumberg et al, 1994; West et al, 1984). Diese Promotoren erlauben eine Expression des von ihnen regulierten Gens in Anwesenheit von Galactose im Wachstumsmedium, werden jedoch von Glucose stark reprimiert. Für eine solide Depletion eines ISC-Gens mit diesem Verfahren ist ein Wachstum der entsprechenden Zellen in glucosehaltigem Medium für ca. 40 bis 64 h nötig.

Im Folgenden wurden daher [ISA1CTD, ISA2NTD]- oder [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen sowie ihre zugehörigen Gal-Promotor-Austauschstämme des Gens IBA57 zum einen und ISA2 zum anderen für insgesamt 64 Stunden in glucosehaltigem Minimalmedium angezogen (Abb. 2.5, A, B). Während der Wachstumsphase wurde die Zellkultur wiederholt verdünnt und Stichproben zu den angezeigten Zeitpunkten entnommen. Nach Abschluss der 64-stündigen Wachstumsphase wurde die Luciferaseaktivität der Proben gemessen. Die Luciferaseaktivität in den [Gal IBA57, ISA1CTD, ISA2NTD]- und den [Gal ISA2, ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen fiel nach spätestens 64 h

Depletion auf das Hintergrundsignal einer Wildtypzelle ab (WT-). Die Kultivierung der gleichen Gal-Promotor-Austausch-Zellen aus Abbildung 2.5, A, B in galactosehaltigem Vollmedium erhielt die enzymatische Aktivität der *Renilla* Split-Luciferase (Abb. 2,5, C). Dies bedeutet, dass die binären Interaktionen zwischen Isa1 und Isa2 von der Anwesenheit von Iba57 abhängen und dass die Bindung von Isa1 an Iba57 von Isa2 abhängig ist. Diese Beobachtung ist am einfachsten damit zu erklären, dass die drei Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 einen trimeren Komplex *in vivo* bilden.

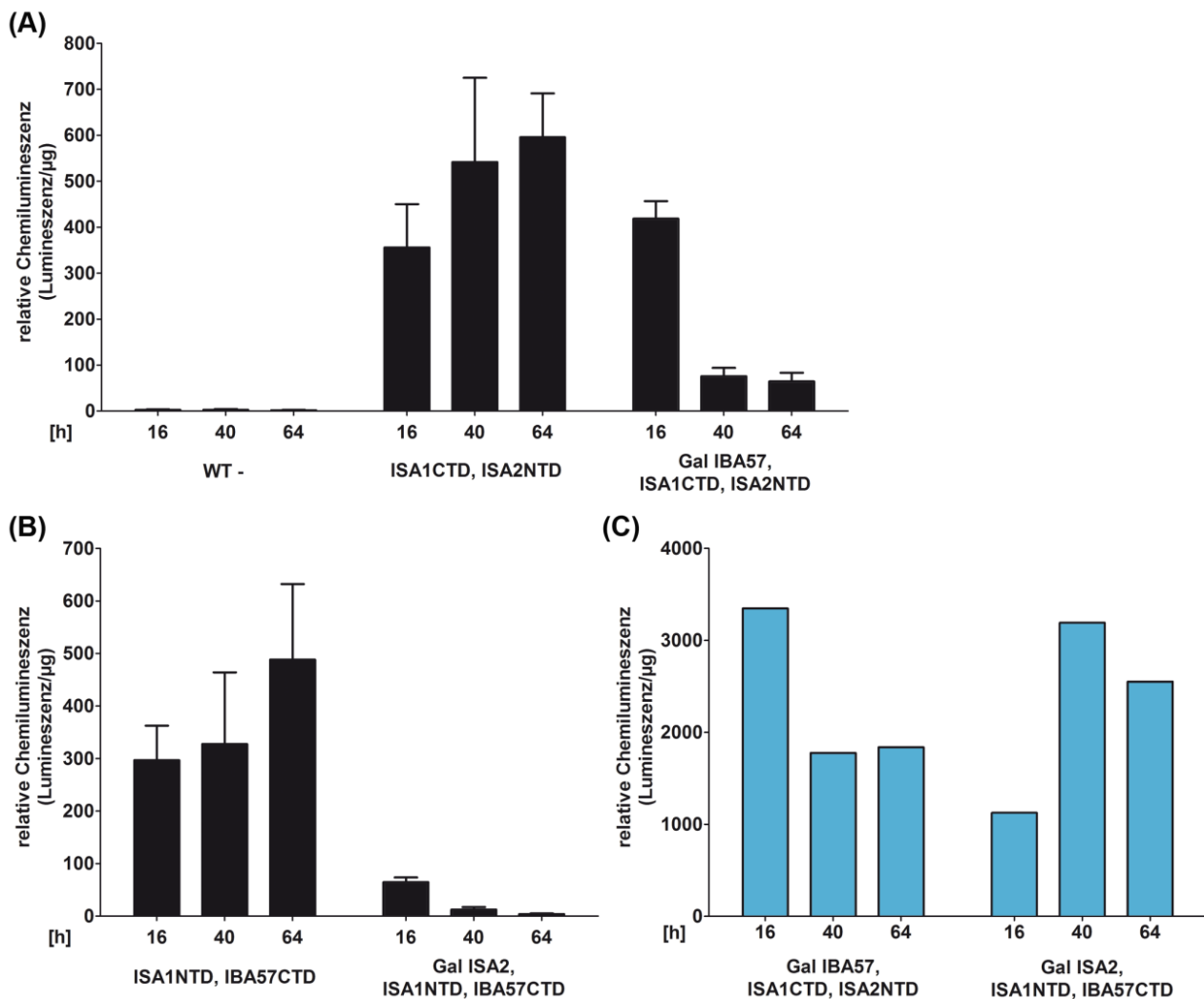


Abbildung 2.5 Die ISC-Komponenten Isa1, Isa2 und Iba57 bilden einen trimeren Komplex *in vivo*. In den Zellen [ISA1CTD, ISA2NTD] und [ISA1NTD, IBA57CTD] wurden zusätzlich IBA57 bzw. ISA2 unter die Kontrolle eines *Gal-1-10*-Promotors gesetzt und die Zellen bis zu 64 h in glucosehaltigem Minimalmedium **(A, B)** oder in galactosehaltigem Vollmedium **(C)** angezogen. Hierbei wurden die Zellkulturen immer wieder verdünnt, Proben nach 16, 40 und 64 h Wachstum entnommen und die Luciferaseaktivität in den Einzelproben bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts wieder (SEM = 3).

2.6 Defekte in der ISC-Maschinerie beeinträchtigen den Isa1, Isa2, Iba57-Komplex

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss eine funktionierende ISC-Maschinerie auf den Isa1, Isa2, Iba57-Komplex hat. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, ob dieser Proteinkomplex ausschließlich bei Bedarf assembliert wird oder ob Teilkomponenten evtl. konstitutiv aneinander gebunden in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* vorliegen. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden zunächst in den [ISA1CTD, ISA2NTD]- bzw. [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen (siehe Kapitel 2.5) die ISC-Gene NFS1, ARH1, SSQ1 oder GRX5 unter die Kontrolle der depletierbaren *Gal-1-10*- oder *GalL*-Promotoren gesetzt (für Details, siehe Stammtabellen im Anhang dieser Arbeit).

Zunächst wurde die Interaktion von Isa1NTD mit Iba57CTD untersucht. Die [Gal-ISC-ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen wurden durch Wachstum in glucosehaltigem Minimalmedium für das entsprechende ISC-Gen depletiert und die Luciferaseaktivität ermittelt (Abb. 2.6.1, A). Es zeigte sich hierbei jedoch, dass die Luciferaseaktivität und damit eine potentielle Interaktion zwischen den beiden Proteinen nur im Wildtyp (Abb. 2.6.1, A) und in Zellen nachweisbar war, welche in galactosehaltigem Medium kultiviert worden waren (Abb. 2.6.1, B) und in denen die ISC-Maschinerie folglich intakt war. Dies legt den Schluss nahe, dass der Komplex zwischen Isa1NTD und Iba57CTD auseinanderfällt, sobald eine der Kernkomponenten der ISC-Maschinerie fehlt.

Um zu klären, ob die Depletion der ISC-Maschinerie eventuell einen generellen Einfluss auf die Luciferaseaktivität des Split-Luciferase-Testsystems hat, wurde der Stamm [Gal-*ARH1*, IDH2NTD, IDH1CTD] hergestellt. Idh1 und Idh2 sind die beiden Untereinheiten des mitochondrialen NAD⁺-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase-Komplexes in *S. cerevisiae*, welcher die Oxidation von Isocitrat zu α -Ketoglutarat im Zitronensäurezyklus katalysiert (Cupp & McAlister-Henn, 1992). Der Isocitrat-Dehydrogenase-Komplex ist nicht abhängig von einer funktionierenden ISC-Maschinerie und folglich sollte es in einer ISC-Mutante nicht zu Änderungen der Protein-Protein-Interaktion und damit der messbaren Luciferaseaktivität der beiden Idh-Luciferase-Fusionsproteine kommen. Wie aus Abbildung 2.6.1, C ersichtlich wird, konnte diese Erwartungshaltung experimentell bestätigt werden.

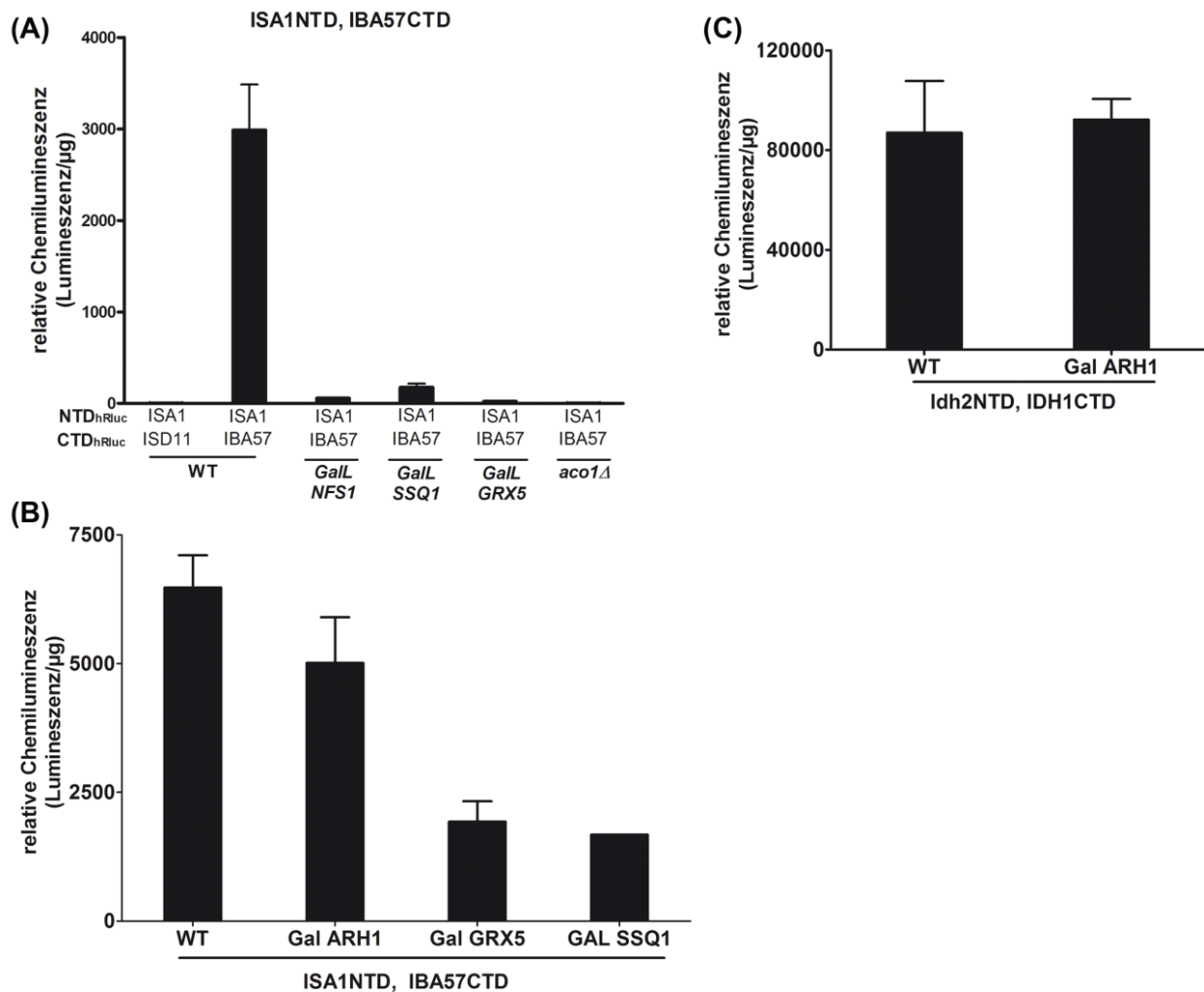


Abbildung 2.6.1 Die Interaktion von *Isa1* und *Iba57* ist abhängig von einer funktionierenden ISC-Maschinerie.

(A) In [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen wurden die Promotoren für die angezeigten ISC-Gene gegen einen *Gal-1-10*- oder einen *GalL*-Promotor ausgetauscht, die Zellen für 40 oder 64 h in glucosehaltigem Minimalmedium angezogen und die Luciferaseaktivität bestimmt. Eine [ISA1NTD, ISD11CTD]-Zelle diente als Referenz für den Nullwert. **(B)** Die Zellen aus (A) wurden parallel für 24 h in galactosehaltigem Vollmedium angezogen. Im Anschluss erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität in den Zelllysaten. **(C)** In einer [IDH2NTD, IDH1CTD]-Zelle wurde der Promotor des Gens *ARH1* gegen einen *Gal-1-10*-Promotor ausgetauscht. Die Zellen wurden für 40 h in glucosehaltigem Medium angezogen und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts wieder (SEM ≤ 5).

Die starke Abnahme der messbaren Luciferaseaktivität in den [Gal-ISC, ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen ließ jedoch Zweifel aufkommen, ob es sich hierbei tatsächlich um eine Abnahme der Protein-Protein-Interaktion oder nicht vielmehr um den Proteinase-bedingten Abbau der beiden Fusionsproteine handelte. Um hierüber Klarheit zu erlangen, wurden Mitochondrien aus dem Wildtyp sowie aus einigen ISC-Mutanten der [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen isoliert, lysiert und in einer SDS-PAGE dem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Abbildung 2.6.2, A zeigt den zugehörigen Immunblot. Die Immundetektion erfolgte mit Antikörpern, gerichtet gegen die beiden hRluc-Domänen und gegen Porin (*Por1*) als Ladekontrolle. Die beiden Luciferase-Domänen wurden mit einem polyklonalen anti-*Renilla* Luciferase-Antikörper der Firma MBL International, Woburn, USA (PM047) detektiert. Die

Immunfärbung zeigte, dass es tatsächlich in allen untersuchten Zellen mit depletierten ISC-Genen zu einem starken Abbau des Iba57CTD-Fusionsproteins sowie zu einer Schwankung des Expressionslevels des Isa1NTD-Proteins kam. Lediglich der Stammhintergrund Gal-*GRX5* lieferte im beschriebenen Experiment einen Expressionslevel beider Fusionsproteine auf annähernd Wildtypniveau. In diesen beiden Zellen wurde daher eine densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten im Immunblot durchgeführt und auf die Signalintensität von Por1 normalisiert. Hieraus wurde der Quotient der Luciferaseaktivität (aus Abbildung 2.6.1, A) pro Protein gebildet (Abb. 2.6.2, B). Dieser war im Vergleich zu [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen in Grx5-depletierten-Zellen sehr gering. Da die Expressionslevel der Fusionsproteine im Wildtyp und der Gal-*GRX5*-Zelle nahezu identisch waren, zeigt dies, dass es bei Depletion von Grx5 zu einem Verlust der Interaktion von Isa1NTD und Iba57CTD kommt. Gal-*GRX5*-Zellen haben einen weniger stark ausgeprägten Phänotyp als Gal-*ARH1*- und Gal-*SSQ1*-Zellen. Der Verlust der Expression der Fusionsproteine in letzteren Zellen deutet also darauf hin, dass es bei stärker ausgeprägten Defekten in der ISC-Maschinerie nach dem Verlust der Interaktion offensichtlich zusätzlich zu einem proteolytischen Abbau der Fusionsproteine kommt.

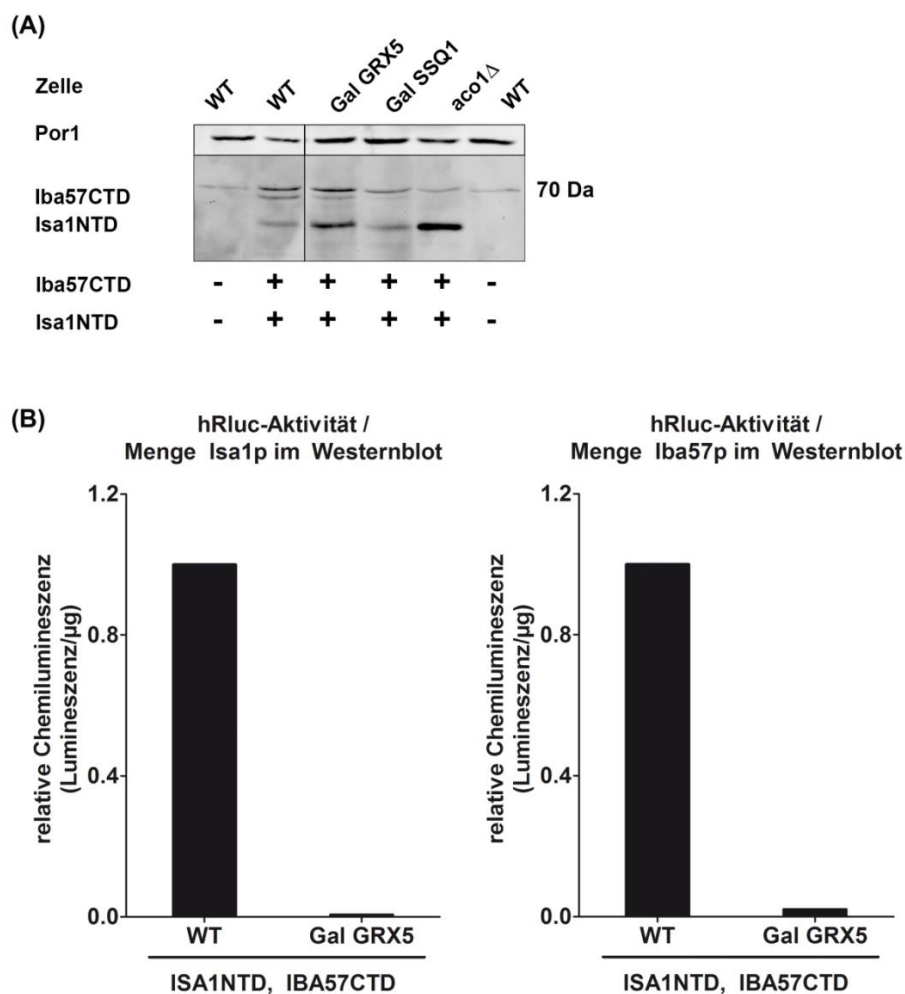


Abbildung 2.6.2 Die Proteine Isa1NTD und Iba57CTD interagieren nicht in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie und werden in der Folge proteolytisch abgebaut. (A) Die in Abbildung 2.6.1 beschriebenen Gal-

Promotor Austausch-Stämme der [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen wurden für 40 bis 64 h in glucosehaltigem Minimalmedium angezogen, die Mitochondrien isoliert, lysiert und die mitochondrialen Proteine TCA-gefällt. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Western-Blots mit Antikörpern, gerichtet jeweils gegen die beiden *Renilla*-Luciferase Domänen und Porin (Por1), immundekoriert. **(B)** Die Banden der Fusionsproteine wurden densitometrisch quantifiziert und auf die Bandenintensitäten von Porin in der gleichen Spur normalisiert. Im Folgenden wurde der Quotient der Luciferaseaktivität (aus Abbildung 2.6.1, A) pro Protein gebildet.

Als nächstes wurden Isa1 und Isa2 auf ihr Interaktionsverhalten unter Bedingungen einer nicht funktionierenden ISC-Maschinerie hin untersucht. Hierzu wurden in den [ISA1CTD, ISA2NTD]-Zellen die ISC-Gene NFS1, ARH1, SSQ1 oder GRX5 unter die Kontrolle eines galactoseregulierbaren Promotors gesetzt (Abb. 2.6.3, A). Auch in diesen Zellen wurde eine Abnahme der Luciferaseaktivität nach Wachstum der Zellen in glucosehaltigem Medium und damit potentiell ebenfalls der Interaktion zwischen Isa1CTD und Isa2NTD beobachtet, wenn auch nicht so stark wie in den [ISA1NTD, IBA57CTD]-Zellen (Abb. 2.6.1, A). Die Deletion des Gens Aconitase (Aco1) hingegen, dem Hauptakzeptor des vom Isa1, Isa2, Iba57-Komplex bereitgestellten [4Fe-4S]-Clusters, schien das Interaktionsverhalten zwischen Isa1CTD und Isa2NTD nicht zu beeinflussen (Abb. 2.6.3, A).

Western-Blot-Analysen der Mitochondrien der [ISA1CTD, ISA2NTD]-Zellen zeigten, dass auch die beiden Fusionsproteine Isa1NTD und Isa2CTD in unterschiedlich starkem Maß in ISC-Mutanten proteolytisch abgebaut wurden (Abb. 2.6.3, B). Allerdings war der Abbau deutlich schwächer als bei Iba57CTD, sodass in allen Zellen die Proteinbanden der beiden Fusionsproteine eindeutig detektiert und im Immunblot densitometrisch quantifiziert werden konnten. Die erhaltenen Werte wurden auf die Signalintensität von Porin normiert. Im Anschluss wurde der Quotient aus der Luciferaseaktivität (aus Abbildung 2.6.3, A) pro Proteinmenge gebildet (Abb. 2.6.3, C). Die Luciferaseaktivität pro Protein war in den entsprechenden Gal-ISC-Zellen im Vergleich zu [ISA1CTD, ISA2NTD]-Zellen sehr gering. Diese Daten zeigen, dass es bei der Depletion von ISC-Genen zu einem Verlust der Interaktion von Isa1CTD und Isa2NTD kommt. Die Expressionslevel der Fusionsproteine im Wildtyp und in Gal-*ARH1*-Zellen waren nahezu identisch. Die Luciferaseaktivität in [Gal-*ARH1*, ISA1CTD, ISA2NTD]-Zellen ging jedoch nicht auf null zurück, sondern zeigte eine Restaktivität von ca. 30%. Dies lässt vermuten, dass Isa1CTD und Isa2NTD zumindest teilweise konstitutiv assoziiert bleiben, unabhängig, ob die ISC-Maschinerie funktioniert (Abb. 2.6.3, C). Der stärkere Verlust der Expression der Fusionsproteine in den übrigen Gal-ISC-Zellen deutet zudem darauf hin, dass es bei stärker ausgeprägten Defekten in der ISC-Maschinerie offensichtlich zusätzlich zu einem proteolytischen Abbau der Fusionsproteine nach dem Verlust der Interaktion kommt. Eine proteolytische Degradation von endogenem Isa2 in ISC-Mutanten ließ sich bisher noch nicht beobachten (Christ, 2011). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass sich die Fusion mit einer der beiden

Luciferase-Domänen negativ auf die Proteinstabilität des jeweiligen Fusionspartners auswirkte. Dieser negative Aspekt war so aus den Vorexperimenten nicht vorherzusehen gewesen. Wegen der hohen Gefahr von Proteinabbau wurde von weiteren Experimenten zur Analyse der Protein-Protein-Interaktion in verschiedenen galactoseregulierbaren ISC-Stämmen abgesehen. Dennoch lieferten die hier aufgeführten Ergebnisse gute Indizien für eine funktionelle Assemblierung eines trimeren Isa1, Isa2, Iba57-Komplexes, der zerfällt, sobald es zu Störungen in der ISC-Maschinerie kommt. Diese Daten sollten jedoch mit einer weiteren Methode verifiziert werden.

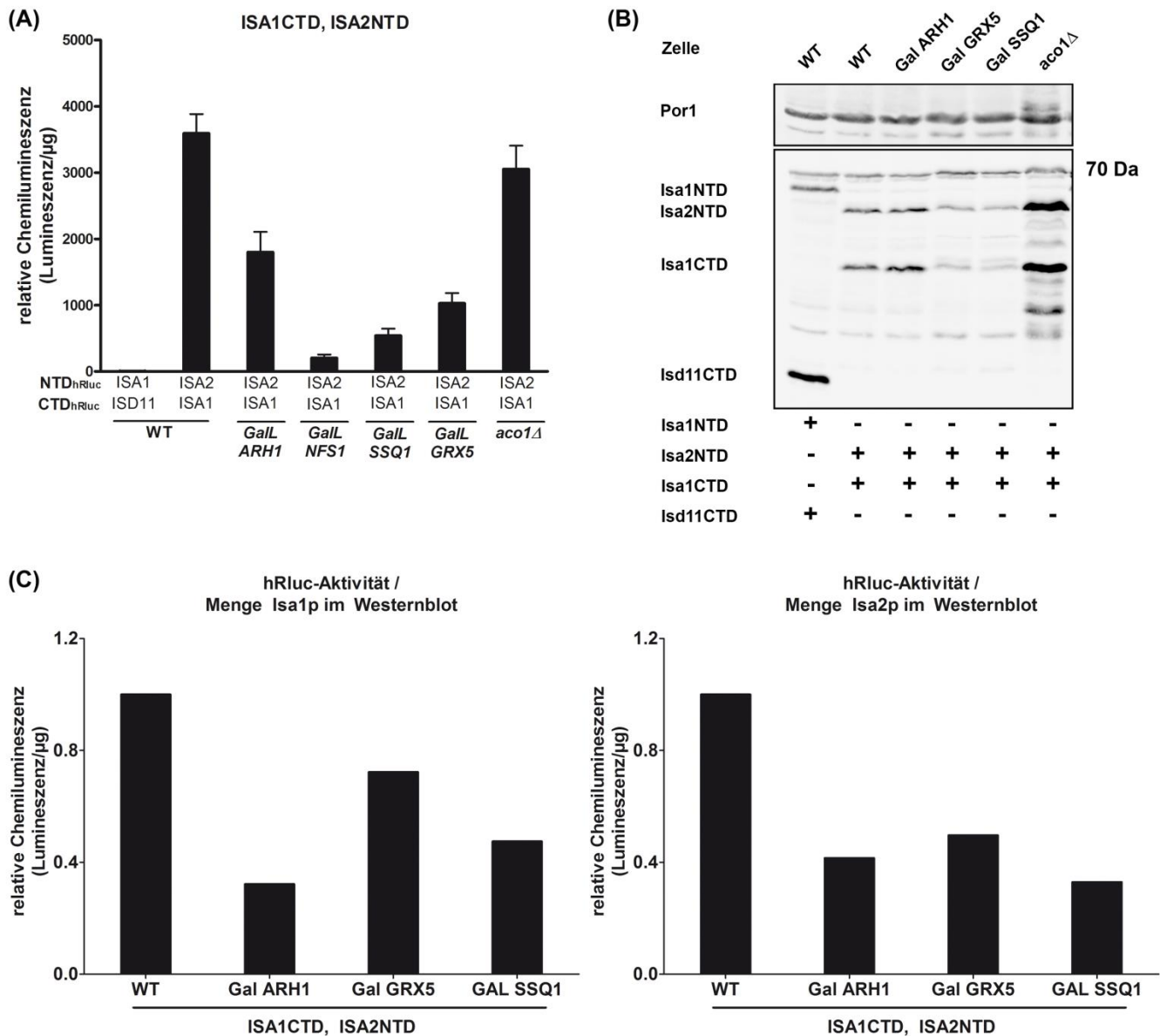


Abbildung 2.6.3 Die Komplexbildung von Isa1 und Isa2 ist teilweise abhängig von einer funktionierenden ISC-Maschinerie. (A) In [ISA1CTD, ISA2NTD]-Zellen wurde ein Promotoraustausch für die angezeigten ISC-Gene gegen einen *Gal-1-10-* oder einen *GalL*-Promotor vorgenommen, die Zellen wurden für 40 oder 64 h in glucosehaltigem Minimalmedium angezogen und die Luciferaseaktivität bestimmt. Eine [ISA1NTD, ISD11CTD]-Zelle diente als Referenz für den Nullwert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts wieder ($SEM \leq 5$). (B) Mitochondrien wurden aus den angezeigten Hefestämmen isoliert und im Anschluss lysiert. Die mitochondrialen Proteine wurden TCA-gefällt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western-Blots

wurden mit Antikörpern gegen die beiden *Renilla* Luciferase-Domänen und gegen Porin (Por1) immundekoriert. **(C)** Die Banden der Fusionsproteine wurden densitometrisch quantifiziert und auf die Bandenintensitäten von Porin in der gleichen Spur normalisiert. Im Anschluss wurde der Quotient der Luciferaseaktivität (aus Abbildung 2.6.3, A) pro Protein gebildet.

2.7 Protein-Protein Interaktionsstudien der späten ISC-Maschinerie mit Hilfe des Split-Luciferase-Testsystems

Das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem sollte nun dazu genutzt werden, um weitere Interaktionspartner des trimeren Komplexes aus Isa1, Isa2 und Iba57 zu charakterisieren. Dazu wurden in den drei Hefestämmen [ISA1NTD], [ISA2NTD] und [IBA57NTD] (grüne Markierung in Abb. 2.7.1, A) weitere Komponenten der ISC-Maschinerie genomisch mit der CTD-hRluc fusioniert (rote Markierung in Abb. 2.7.1, A). Zudem wurde die funktionelle Beteiligung von Yah1 am Prozess der Fe/S-Cluster-Konversion untersucht. Dazu wurden in einer [YAH1CTD]-Zelle (rote Markierung in Abb. 2.7.2, A) verschiedene weitere Komponenten der späten ISC-Maschinerie mit der NTD-hRluc fusioniert (grüne Markierung in Abb. 2.7.2, A). Weiterhin sollte die funktionelle Interaktion von Nfu1 mit der späten ISC-Maschinerie analysiert werden (Abb. 2.7.3). Die Ergebnisse der einzelnen Fragestellungen werden im Folgenden zusammengefasst. Hefezellen, welche die entsprechenden hRluc-Fusionsproteine exprimierten, wurden in Minimalmedium über Nacht angezogen, verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase weiterkultiviert. Im Anschluss wurde die Luciferaseaktivität der Proben bestimmt.

1. In den Zellen [ISA1NTD, IBA57CTD] und [ISA1CTD, ISA2NTD] wurde jeweils eine hohe Luciferaseaktivität gemessen (Abb. 2.7.1, B-D). Eine ähnlich hohe Signalintensität wurde zudem in [ISA1NTD, ISA2CTD]-Zellen ermittelt, in denen die hRluc-Domänen an Isa1 und Isa2 vertauscht wurden (Abb. 2.7.1, B). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass Isa1 und Isa2 miteinander interagieren, und dass sich zusätzlich die hRluc-Domänen an diesen Fusionsproteinen in enger räumlicher Nähe zueinander befinden. In der Zelle [ISA2NTD, IBA57CTD] war die Luciferaseaktivität hingegen nahezu null (Abb. 2.7.1, D, ganz rechts). Da die Zellen [ISA1NTD, IBA57CTD] und [ISA1CTD, ISA2NTD] jeweils ein starkes Luciferasesignal zeigten, ist es unwahrscheinlich, dass Isa2 und Iba57 nicht miteinander interagieren. Dies legt den Schluss nahe, dass die hRluc-Domänen an Isa2 und Iba57 weiter voneinander entfernt sind und durch ihre Fusionsproteine sterisch voneinander abgeschirmt werden.

2. Die Zellen [ISA1NTD, GRX5CTD] und [ISA2NTD, GRX5CTD] zeigten eine hohe Luciferaseaktivität (Abb. 2.7.1, B, C). In den Zellen [ISA1NTD, SSQ1CTD] und [ISA2NTD, SSQ1CTD] konnte ebenfalls eine hRluc-Aktivität ermittelt werden, die jedoch verglichen mit den erstgenannten Zellen deutlich geringer ausfiel. Die schwächere Luciferaseaktivität in Kombination mit Ssq1CTD legt den Schluss nahe, dass die hier gemessene scheinbare Interaktion der Isa-Proteine mit Ssq1 tatsächlich ein indirekt vermittelter Kontakt über das direkt gebundene Grx5 ist. Diese Hypothese muss jedoch mit einer zusätzlichen Analyseverfahren verifiziert werden. Mit dem Split-Luciferase-System konnte keine Interaktion von Iba57NTD mit Grx5CTD oder Ssq1CTD nachgewiesen werden (Abb. 2.7.2, D).

3. Zur Untersuchung der Interaktionspartner des Ferredoxins wurde das Gen YAH1 mit einer CTD-hRluc fusioniert. Yah1CTD zeigte eine hohe Luciferaseaktivität mit Isa1NTD, Isa2NTD und Iba57NTD nicht jedoch mit Jac1NTD oder den Fe/S-Zielproteinen Lip5NTD, Sdh2NTD und Bio2NTD. Eine Interaktion mit letzteren Proteinen gilt als unwahrscheinlich und spricht für eine spezifische Bindung von Yah1 an die Proteine Isa1, Isa2 und Iba57. [YAH1CTD, ISU2NTD]-Zellen zeigten jedoch ebenfalls keine Luciferaseaktivität, wobei Yah1 mit dem Paralog Isu1 in Hefe interagiert (Webert, 2011). Die Daten zu den Interaktionspartnern von Yah1 müssen daher ebenfalls mit einer unabhängigen Methode verifiziert werden.

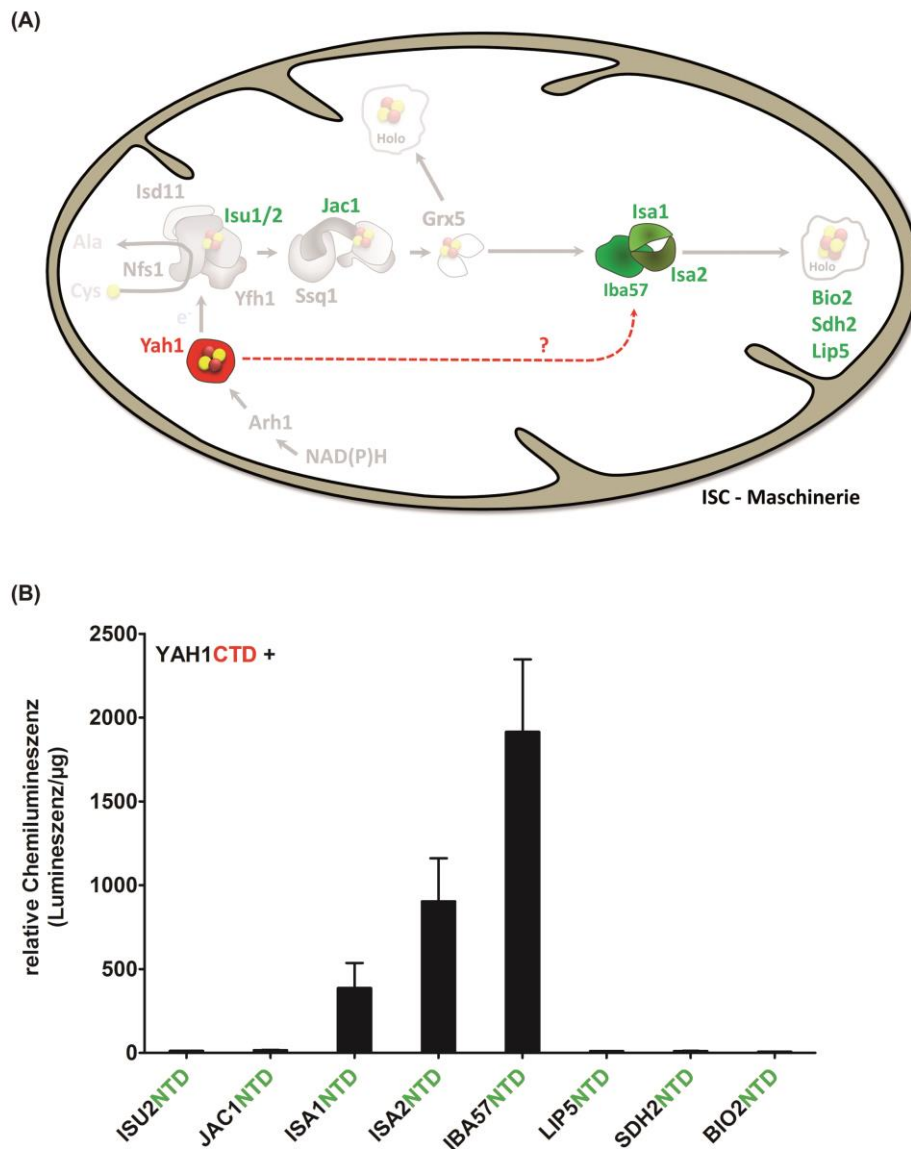


Abbildung 2.7.2 Das Split-Luciferase-Testsystem liefert erste Indizien, dass das ISC-Protein Yah1 mit dem trimeren Komplex aus Isa1, Isa2 und Iba57 interagiert. (A) Vereinfachte schematische Darstellung der mitochondrialen ISC-Maschinerie. Im Hefestamm [YAH1CTD] (rote Markierung) wurden jeweils die indizierten mitochondrialen Gene an die NTD-hRluc-Domäne fusioniert (grüne Markierung). (B) Die Hefestämme wurden in Minimalmedium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts wieder ($SEM \leq 8$).

4. Zur Analyse der möglichen Interaktionen von Nfu1 mit den Komponenten der späten ISC-Maschinerie wurden in einer [NFU1NTD]-Zelle verschiedene weitere Gene mit der CTD-hRluc fusioniert und die Luciferaseaktivität ermittelt (Abb. 2.7.3). In allen Hefestämmen (in Abbildung 2.7.3) wurde eine sehr hohe Luciferaseaktivität gemessen. Nfu1NTD/Nfu1CTD schien mit jedem getesteten Protein zu interagieren. Nfu1 ist ein stark exprimiertes Protein in der mitochondrialen Matrix von *S. cerevisiae* (Ghaemmaghami et al, 2003). Eine Interaktion von Nfu1 mit allen Proteinen, abgebildet in 2.7.3, ist äußerst unwahrscheinlich. Das Split-Luciferase-Testsystem tendiert folglich bei starker Expression der untersuchten Fusionsproteine zu einer

konzentrationsabhängigen Autoassemblierung der Teildomänen. Die zwei mitochondrial stark exprimierten Komponenten des Isocitrat-Dehydrogenase-Komplexes, Idh1 und Idh2 (Cupp & McAlister-Henn, 1993), lieferten in Kombination mit verschiedenen ISC-Proteinen ebenfalls äußerst hohe Luciferasesignale nach Fusion an eine der hRluc-Domänen (Daten nicht gezeigt, für Details zu den generierten Stämmen, siehe Abb. 2.7.4). Eine funktionelle Interaktion dieser Proteine mit der ISC-Maschinerie ist auszuschließen.

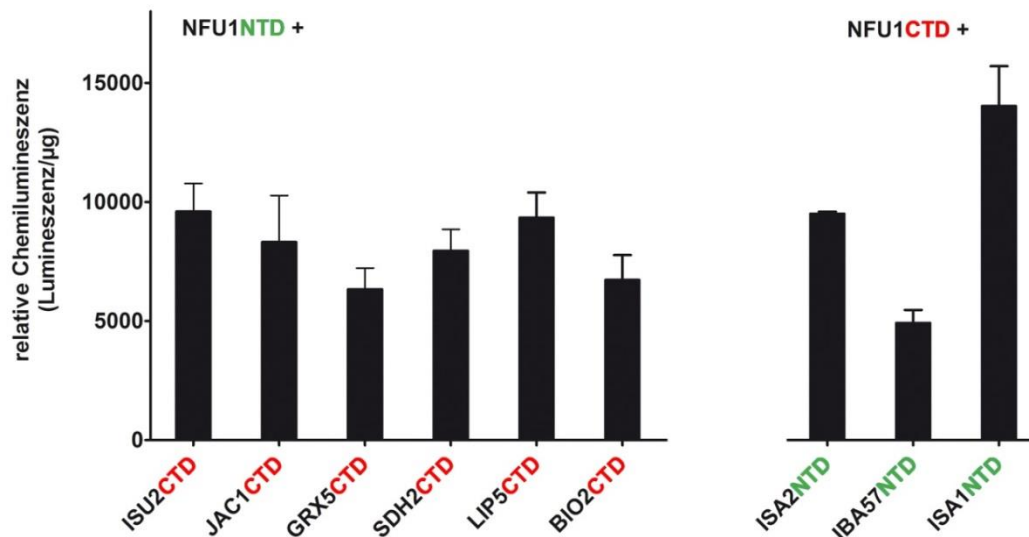


Abbildung 2.7.3 Nfu1 interagiert in einem *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem scheinbar mit allen Proteinen. Im Genom von [NFU1NTD]/[NFU1CTD]-Zellen wurde mit Hilfe PCR-basierter Methoden jeweils eines der indizierten Gene an die jeweils komplementäre hRluc-Domäne fusioniert. Die Hefestämme wurden in Minimalmedium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen und im Anschluss die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts wieder (SEM = 2).

5. Weiterhin sollte eine eventuell bestehende funktionelle Interaktion der BolA-ähnlichen Proteine mit der späten ISC-Maschinerie analysiert werden. Die Kombination aus einer fusionierten hRluc-Domäne an Yal044w-a (Bol1) oder Yal046c (Bol3) mit einem weiteren ISC-Fusionsprotein lieferte jedoch nur äußerst schwache Luciferase-Signale, sodass von einer weitergehenden Analyse des Interaktionsverhaltens der beiden Yal-Proteinen abgesehen wurde (für Details zu den generierten Stämmen, siehe Abb. 2.7.4).

NTD	ISU2	JAC1	ISA1	ISA2	IBA57	NFU1	LIP5	SDH2	BIO2	YAL046C	IDH2
CTD											
ISD11	-	-		-	-	-	n	n	n	-	-
YAH1						-				-	
ISU2	-	-	-	-			-	-	-	-	-
SSQ1	-	-				-	-	-	-	-	-
JAC1	-	-		-			-	-	-	-	-
GRX5	-	-					-	-	-	-	
ISA1	-	-	-		-	-	n	n	n	-	
ISA2	-	-	-	-	-	-	n	n	n	-	-
IBA57	-	-			-	-	n	n	n	-	-
NFU1	-	-				-	-	-	-	-	
LIP5	-	-	-	-	-		-	-	-	n	-
SDH2	-	-	-	-	-		-	-	-	n	-
BIO2	-	-	-	-	-		-	-	-	n	-
YAL046C	-	-	-			-	n	n	n	-	-
YAL044W-A	-	-	-	-	-	-	n	n	n		-
IDH1	-	-		-		-	-	-	-	-	
IDH2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbildung 2.7.4 Kreuzschema der in dieser Arbeit generierten ISC-Fusionsproteine mit einer hRluc-Domäne in den Mitochondrien von *S. cerevisiae*. Die indizierten Gene wurden genomisch entweder mit der NTD-hRluc oder der CTD-hRluc in einer Wildtyphefe fusioniert. Die Hefestämme wurden in Minimalmedium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen und die Luciferaseaktivität bestimmt. **Grün:** hohe Luciferaseaktivität; **dunkelgrau:** keine Luciferaseaktivität, genomische Insertion der hRluc-Domäne mit Kolonie-PCR bestätigt; **n:** keine Hefekclone erhalten; **-:** Zellen nicht erstellt

Das hier etablierte *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem kann grundsätzlich für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden (Abb. 2.7.4). Hierbei ist seine Anwendbarkeit jedoch im Allgemeinen in Mitochondrien auf Proteine mit einem mittleren Expressionslevel von 1500 - 6000 Moleküle pro Zelle limitiert. Bei stärkerer Expression eines mitochondrialen Proteins kann dies zu einer konzentrationsabhängigen Assemblierung der hRluc-Domänen führen, wodurch mit dieser Technik keine spezifische Interaktion der untersuchten Proteine mehr nachweisbar ist (Abb. 2.7.3). Umgekehrt führte ein Expressionslevel kleiner 1500 Moleküle pro Zelle in der vorliegenden Arbeit in der Regel dazu, dass keine hRluc-Aktivität der Proben mehr nachweisbar war (Ausnahme: Isa1 mit 125 Molekülen pro Zelle). Weitere Einschränkungen des Testsystems bestehen zum einen in der Möglichkeit der sterischen Abschirmung der hRluc-Domänen durch die Fusionsproteine (Abb. 2.7.4, [IBA57CTD, ISA2NTD]) und zum anderen ist es nicht möglich, jedes beliebige Gen am 3'-Ende mit einer der beiden unterschiedlich großen hRluc Domänen zu fusionieren (Abb. 2.7.4, n: keine Hefekclone erhalten). Grundsätzlich schließt dies die Verwendung des *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems in Mitochondrien jedoch nicht aus. So eignete sich das hier vorgestellte Testsystem für

die Analyse der binären Interaktionen zwischen den Proteinen Isa1, Isa2 und Iba57. Es konnten zudem erstmalig experimentelle Hinweise auf das Vorliegen eines trimeren Komplexes dieser drei Proteine *in vivo* gefunden werden. Zudem zeigte die binäre Interaktion zwischen Isa1 und Iba57 einen dynamischen Interaktionsverlust in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie. Die Daten legen weiterhin die teilweise Assemblierung eines Subkomplexes von Isa1 und Isa2 in den gleichen Zellen nahe. Es zeigte sich jedoch auch, dass es bei der Analyse von dynamischen Protein-Protein-Interaktionen zum Abbau der hRluc-Fusionsproteine in Mitochondrien kommen kann. Ob ein spezielles Protein für die Analyse mit dieser Technik zugänglich ist, muss im Einzelfall experimentell ermittelt werden.

Diskussion

In *S. cerevisiae* sind drei Proteinmaschinerien für die *de novo* Biogenese von Fe/S-Clustern und deren Inkorporation in Zielproteine verantwortlich: die mitochondriale ISC- (iron sulfur cluster) Maschinerie, das ISC-Export-System sowie das CIA- (cytosolic iron-sulfur-protein assembly) System. Für die mitochondriale ISC-Maschinerie ist der Mechanismus der *de novo* Assemblierung eines [2Fe-2S]-Clusters auf dem Gerüstprotein Isu1 und dessen anschließender Transfer mit Hilfe eines Chaperonsystems auf das Glutaredoxin Grx5 funktionell gut verstanden. Wenig beschrieben ist hingegen die Funktionsweise der späten ISC-Komponenten Isa1, Isa2 und Iba57, welche in einem bisher unbekannten Mechanismus die Konversion in einen [4Fe-4S]-Cluster auf Fe/S-Zielproteinen katalysieren. Zudem wurde bisher wenig untersucht, wie Fe/S-Zielproteine an die Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerien herangeführt werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde daher versucht, weiterführende Einblicke in die Maturierung von Fe/S-Zielproteinen zu gewinnen. Zum einen sollte der Redoxzustand der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen unmittelbar vor Insertion des Fe/S-Clusters analysiert werden. Zum anderen wurde ein Protein-Fragment-Komplementationssystem in Mitochondrien entwickelt, um das Interaktionsnetzwerk der späten ISC-Komponenten Isa1, Isa2 und Iba57 zu untersuchen.

Teilprojekt I: Defekte in der ISC-Maschinerie führen zur Akkumulation von mitochondrialen Apo-Fe/S-Zielproteinen mit abgeschirmten Cysteinliganden

Das erste Teilprojekt der vorliegenden Dissertation beschäftigt sich mit dem Redoxzustand der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Zielproteinen unmittelbar vor der Insertion des Fe/S-Clusters. Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass cytosolische Apo-Fe/S-Zielproteine ihre Cysteinliganden freisexponieren und erst durch die Inkorporation eines Fe/S-Clusters von einer Cystein-SH-Modifikation abgeschirmt werden (Christ, 2011). Im Gegensatz dazu sind die Cysteinliganden von mitochondrialen Apo-[2Fe-2S]-Proteinen zu keinem Zeitpunkt ihrer Maturierung in der mitochondrialen Matrix exponiert (Christ, 2011). Mitochondriale Apo-[4Fe-4S]-Proteine zeigen hingegen eine Dynamik in der Zugänglichkeit ihrer Fe/S-Cluster-Liganden (Abb. D1). In Zellen mit Defekten innerhalb der Kern-ISC-Maschinerie sind ihre Cysteinliganden von der Matrix abgeschirmt. Sobald Zellen Defekte in der späten ISC-Maschinerie aufweisen, liegen ihre Fe/S-Cluster-Liganden freisexponiert vor (Christ, 2011). Die einzige Abweichung in der Zugänglichkeit der Fe/S-Cluster-Liganden wurde für die Kern-ISC-Komponente Grx5 beobachtet (Abb. D1). In Zellen, in denen Grx5 depletiert wurde, sind die Cysteinliganden von Apo-[4Fe-4S]-Proteinen frei zugänglich, die von [2Fe-2S]-Proteinen allerdings unzugänglich.

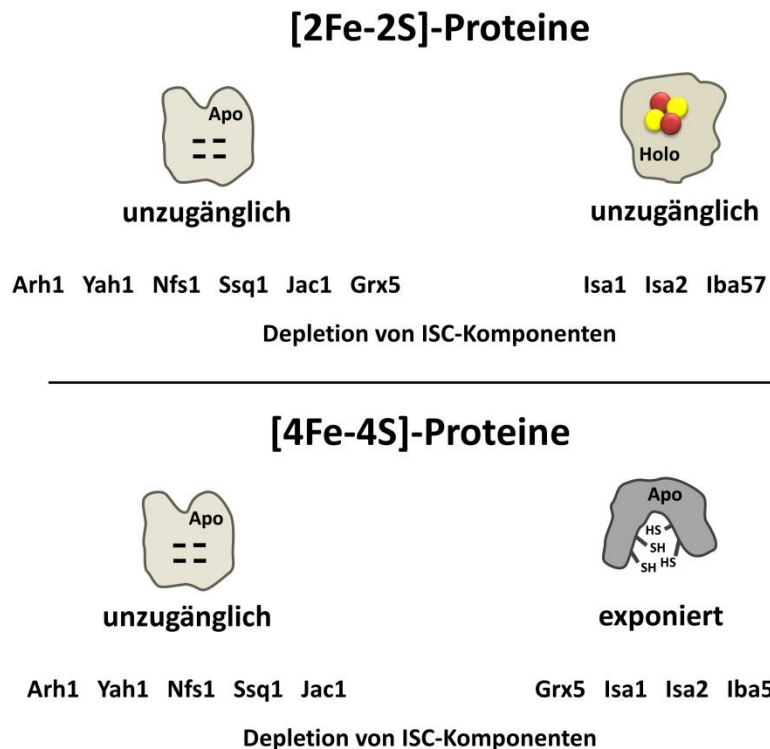


Abbildung D1 Zugänglichkeit der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen in Mitochondrien von *S. cerevisiae*. In verschiedenen Hefezellen wurden die indizierten ISC-Komponenten mit Hilfe eines galactoseregulierbaren Promotors depletiert. Im Anschluss wurden die Mitochondrien isoliert und unter nativen Bedingungen mit einer Cystein-SH-Sonde gemäß Abbildung 1.4.3 modifiziert. Die Zugänglichkeit der Cysteinliganden von [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Proteinen für eine stabile Modifikation mit einer Maleimidsonde ist schematisch für die untersuchten Zellen dargestellt.

In der vorliegenden Dissertation wurde die molekulare Ursache für die Abschirmung der Cysteinliganden von mitochondrialen Apo-Fe/S-Zielproteinen in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie identifiziert. Die massenspektrometrische Analyse eines nativ in seiner Apo-Form aus den Mitochondrien von Hefezellen mit Defekten in der Kern-ISC-Maschinerie gereinigten Fe/S-Proteins offenbarte Massenaddukte von +30 bis +32 Da über dem Molekül-Ion Signal des unmodifizierten Proteins (Abb. 1.3.1). Diese Massenaddukte konnten durch TCEP vollständig entfernt werden (Abb. 1.3.1, D). Entsprechend konnten die *in vivo* abgeschirmten Cysteinseitenketten von Apo-Fe/S-Proteinen durch vorherige Reduktion *in vitro* für die Modifikation mit einer Cystein-SH-Sonde zugänglich gemacht werden. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass die Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen über eine Disulfidbrücke mit einer Schwefelspezies verbunden sind. Durch die exakte Bestimmung des Centroids der Massenhöchstwerte konnte weitergehend nahegelegt werden, dass Apo-Fe/S-Proteine Polysulfide auf ihren Cysteinliganden akkumulieren (Abb. D2). Die ermittelten Massendifferenzen legen den Schluss nahe, dass die hier untersuchten Apo-Fe/S-Proteine mit Polysulfidketten mit bis zu vier verbrückenden Schwefeln an den Cysteinliganden modifiziert waren (Abb. D2, Kasten 4). Ob der hier beobachtete oxidative Ringschluss der

Polysulfidmodifikation bereits *in vivo* eingeführt wird bleibt zu ermitteln. Die Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen müssen *in vivo* zunächst mit einem Persulfid oder Polysulfan geschützt und durch einen zweiten oxidativen Reaktionsschritt verbrückt werden. Die in der massenspektrometrischen Analyse aufgefundenen Polysulfide stellen somit eventuell bereits das Produkt eines Schutzmechanismus dar.

Es blieb also die Frage zu klären, ob die beobachtete Schwefelmodifikation auf Apo-Fe/S-Proteinen tatsächlich einen physiologischen Schutzmechanismus der oxidationsempfindlichen Cysteinliganden darstellt, oder ob diese lediglich in ISC-Mutanten in Anwesenheit eventuell erhöhter Level an ROS auftritt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch in den Massenspektren eines Fe/S-Proteins aus Wildtyphefzellen die gleichen TCEP-sensitiven Massenaddukte wie in der untersuchten ISC-Mutante gefunden, wenn auch in geringerem Maße (Abb. 1.4.1). Die Menge dieser Cysteinaddukte verstärkte sich, wenn Wildtyphefen unter Eisenmangelbedingungen kultiviert wurden (Abb. 1.4.4) und fanden sich ebenfalls auf Mutanten von Fe/S-Proteinen, welche keinen Fe/S-Cluster mehr binden können (Abb. 1.4.2). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass die Modifikation der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen mit Per- oder Polysulfiden auch in Wildtyphefzellen vorkommt.

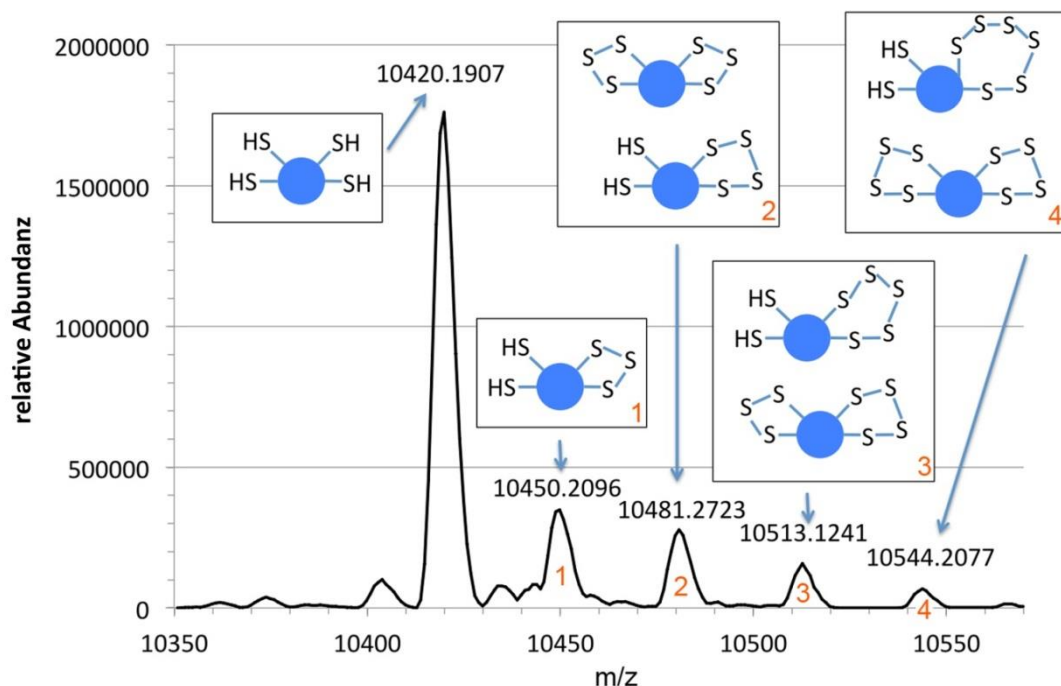


Abbildung D2 Zellen mit Defekten in der mitochondrialen Fe/S-Cluster Assemblierungsmaschinerie akkumulieren Polysulfidaddukte auf den Cystein-Liganden ihrer Apo-Fe/S-Proteine. Im Massenspektrum von HiPIP-FLAG aus Gal-ARH1-Zellen (Abb. 1.3.1, B) wurden die einzelnen Molekül-Ion Signale integriert und der jeweilige Centroid mathematisch bestimmt. Den errechneten Massespezies lassen sich die dargestellten Polysulfidmodifikationen zuordnen.

Da diese Art der Modifikation in Zellen zudem reversibel eingeführt wird und reduktiv entfernbar ist, spricht somit viel für einen physiologischen Schutzmechanismus. Vor allem in Mitochondrien könnte ein derartiger Schutzmechanismus der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen entscheidende Vorteile bieten. Mitochondrien sind die größte Quelle für die Freisetzung von ROS (reactive oxygen species) innerhalb der Zelle. Die Menge an freigesetzten $O_2^{\bullet-}$ sowie H_2O_2 innerhalb der mitochondrialen Matrix ist direkt abhängig von der Stoffwechsellast des Organells und der Art der umgesetzten Substrate (Murphy, 2009; Quinlan et al, 2013; Sabharwal & Schumacker, 2014). Schäden, verursacht durch unspezifische Oxidation von Proteinen mit ROS oder RNS (reactive nitrogen species), sind eng assoziiert mit verschiedensten Krankheitsbildern, verursacht durch oxidationsabhängige Degradation von Proteinen bis hin zu kanzerogenen DNA-Schäden (Murphy, 2009). Oxidationsschäden an Cysteinseitenketten treten im Speziellen oft graduell auf. Dabei wird die Thiolgruppe zunächst mit nur einem Sauerstoffatom oxidiert zu Sulfensäure. Diese kann letztendlich weiter über Sulfin- zu Sulfonsäure oxidieren. Die Sulfonsäure stellt ein irreparables Oxidationsprodukt dar und führt zwangsläufig zum proteolytischen Abbau des betroffenen Proteins (Kiley & Storz, 2004; Rinalducci et al, 2008). Die direkte oxidative Modifikation der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen durch verschiedene ROS-Spezies verhindert die Insertion des Fe/S-Clusters und führt damit zur Akkumulation der Apo-Form. Die in dieser Arbeit beschriebene Polysulfidmodifikation könnte somit einen Schutz gegenüber oxidationsbedingter Schädigung und dem daraus resultierenden proteolytischen Abbau der Apo-Fe/S-Proteine in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* darstellen, indem sie eine direkte Oxidation der Cystein-SH-Gruppe verhindert und sich selbst im oxidierten Zustand reduktiv entfernen lässt. Dieser Mechanismus könnte sich auf Grund der besonderen physikochemischen Eigenschaften dieses Kompartiments entwickelt haben. Der pH von Mitochondrien liegt mit 7,5 (in *S. cerevisiae*) bzw. 8.0 (in HeLa-Zellen) deutlich höher als der des Cytosols (pH=7,2) (Abad et al, 2004; Orii et al, 2009). Der physiologische pK_a der Aminosäure Cystein liegt zwischen 8 bis 9 und ist zudem stark abhängig von dem umgebenden Proteinmikromilieu (Ferrer-Sueta et al, 2011; Weerapana et al). In den Mitochondrien liegt die Cystein-SH-Gruppe daher zu mehr als zwei Dritteln als negativ geladenes Thiolat vor (Requejo et al, 2010). Diese Bedingungen machen Cysteinseitenketten in Mitochondrien ca. fünffach reaktiver gegenüber den übrigen zellulären Kompartimenten (Kabil et al, 2014; Requejo et al, 2010). Werden isolierte Mitochondrien einem oxidativen Stress ausgesetzt, so ist die Menge an oxidativen Modifikationen auf exponierten Cysteinen 10 bis 20 % größer als die des gesamten Glutathionpools (Requejo et al, 2010). Dieser Umstand veranschaulicht, wie kritisch es für die Zelle ist, ein stabiles Redoxpotential aufrecht zu erhalten und zudem kritische, exponierte Cysteinseitenketten durch reversible Cystein-SH-Modifikationen wie Glutathionylierung, Polythiolierung, Nitrosylierung oder Peroxidierung zu schützen (Murphy, 2012). Es gibt verschiedene Beispiele für nicht-Fe/S-Proteine, die mit Hilfe einer

physiologisch eingeführten Persulfidmodifikation entweder vor Oxidationsschäden geschützt oder die in ihrer Aktivität geregelt werden (Mishanina et al, 2015). Die Superoxid-Dismutase wird zum Beispiel durch die Einführung eines Persulfids auf einem einzelnen Cystein gegen oxidationsabhängige Aggregation geschützt (de Beus et al, 2004). Warum sollten jedoch auch die Cysteinliganden von mitochondrialen Apo-Fe/S-Proteinen spezifisch durch eine endogene Modifikation mit einem Per- oder Polysulfid geschützt werden? Der Import von Fe/S-Proteinen in die mitochondriale Matrix ist nicht an die Insertion des Fe/S-Kofaktors gekoppelt (Duby et al, 2002). Zudem sind Apo-Fe/S-Proteine großteilig löslich in wässriger Lösung und müssen daher bereits weitestgehend gefaltet sein (Pierik et al, 2009; Sau et al, 2001). Folglich müssen sich auch die Cysteinliganden in Apo-Fe/S-Proteinen bereits in enger räumlicher Nähe zueinander befinden, was wiederum die Stabilität und die Ausbildung von Disulfidbrücken und Polysulfiden in der mitochondrialen Matrix begünstigt (Longen et al, 2014). Die in dieser Arbeit präsentierten Daten legen folglich den Schluss nahe, dass Apo-Fe/S-Proteine im Allgemeinen in Mitochondrien mit einer Per- oder Polysulfidmodifikation vor unspezifischer, direkter Oxidation der Cysteinliganden geschützt werden. Dies verhindert die Akkumulation und den darauf folgenden Abbau von Fe/S-Proteinen in ihrer Apo-Form in den Mitochondrien von *S. cerevisiae*.

Es bleibt die Frage zu klären, wer für die Einführung der Cystein-SH-Modifikation in mitochondriale Apo-Fe/S-Proteine verantwortlich ist. Schwefelmodifikationen werden vor allem in Transsulfurationsreaktionen zwischen zwei Cysteinseitenketten übertragen. Bekannte Enzymklassen, die diese Reaktion katalysieren, sind Desulfurasen und Rhodanesen (Mueller, 2006). Die Beteiligung der Cystein-Desulfurase Nfs1 sowie der mitochondrialen Rhodanesen Rdl1 und Rdl2 an der Einführung der Cysteinpolysulfidmodifikation auf Apo-Fe/S-Proteinen konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden (Abb. 1.5). Weiterhin können Cysteinseitenketten oxidativ mit H_2S zu Cysteinpersulfiden und -polysulfanen modifiziert werden (Ida et al, 2014). H_2S ist ein gasförmiges, membrangängiges Regulatormolekül für verschiedenste Stoffwechselprozesse, ähnlich zum NO (Kabil et al, 2014; Kimura, 2014; Kimura, 2015; Mishanina et al, 2015; Modis et al, 2014; Szabo et al, 2014). Berichte, dass H_2S zusätzlich als gasförmiger Redoxpuffer in der Zelle fungieren könnte, wurden kürzlich widerlegt (Mishanina et al, 2015). Die Konzentration an freiem H_2S in der Zelle ist viel zu gering, um eine derartige Funktion zu übernehmen, da sie durch den Sulfid-Degradations-Stoffwechselweg in den Mitochondrien auf einem konstanten und subtoxischen Level von 10-20 nM gehalten wird (Kabil et al, 2014). Da H_2S in wässriger Lösung jedoch spontan Polysulfane bildet, wirkt es als Oxidant und kann daher mit exponierten Cystein-SH-Gruppen reagieren (Greiner et al, 2013). Die Kinetik der Oxidation von Sulfiden in wässriger Lösung läuft am schnellsten zwischen pH 7 und 9 ab, wobei das Reaktionsoptimum bei pH 8 und pH 11 liegt (Chen & Morris, 1972). In Mitochondrien ist das membrangängige H_2S folglich das bessere Oxidationsmittel für exponierte Thiolgruppen. In

der Hefe sind zusätzlich drei Proteine an der Freisetzung und der anschließenden direkten Übertragung von H_2S in Form eines Persulfids auf verschiedenste Akzeptorproteine beteiligt (Ida et al, 2014). Dies sind zum einen zwei Proteine aus dem Cysteinbiosynthese-Stoffwechselweg: die Sulfurtransferasen Cystathion β -Synthase (Cys4) und Cystathion γ -lyase (Cys3). Beide setzen große Mengen an Glutathionpersulfid und anderer Polysulfanderivate frei und übernehmen damit zusätzlich eine Funktion im Hinblick auf Regulation und Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (Ida et al, 2014). Zudem wird H_2S in Eukaryoten in größeren Mengen von dem Sulfat-Assimilations-Stoffwechselweg freigesetzt (Hebert et al, 2013; Linderholm et al, 2008). In der vorliegenden Dissertation zeigten die Deletionen der genannten drei Gene jedoch keine Wirkung auf die Polysulfidmodifikation von Apo-Fe/S-Proteinen. Die gewonnenen Daten sind allerdings noch nicht aussagekräftig, da lediglich Einzeldelationen der Gene CYS3, CYS4 und MET5 vorgenommen werden konnten und eine hohe funktionelle Redundanz und Kopplung der drei Enzyme untereinander besteht. Zumindest die zusätzliche Deletion eines ISC-Gens wäre nötig gewesen, um eine Aussage zur Zugänglichkeit der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen in diesen Zellen treffen zu können. Bisher waren diese Experimente auf Grund von Wachstumsdefekten der erstellten Einzeldelationsstämme in Flüssigkulturmedium jedoch nicht möglich. Eine H_2S -abhängige Modifikation der Cysteinliganden von mitochondrialen Apo-Fe/S-Proteinen stellt somit weiterhin einen plausiblen Reaktionsmechanismus dar. Der physiologische Donor bleibt jedoch zu ermitteln.

Eine weitere zu klärende Frage besteht darin, warum die Fe/S-Cluster-Liganden von Apo-[4Fe-4S]-Proteinen nicht jedoch von Apo-[2Fe-2S]-Proteinen frei zugänglich sind in Zellen, in denen die Kern-ISC-Komponente Grx5 depletiert wurde (Abb. D1). Apo-[4Fe-4S]-Proteine weisen exponierte Cysteinliganden und eine vermehrte Degradation in Zellen mit Defekten in der späten ISC-Maschinerie auf (Christ, 2011). Der molekulare Mechanismus der Fe/S-Cluster-Konversion ist noch nicht verstanden. Grx5 ist der erste ISC-Assemblierungsfaktor, welcher einen [2Fe-2S]-Cluster von Isu1 annimmt und diesen an [2Fe-2S]-Zielproteine weiterreicht (Uzarska et al, 2013). Zudem reicht Grx5 nach einem derzeitigen Modell seinen [2Fe-2S]-Cluster auch an die späten ISC-Komponenten Isa1, Isa2 und Iba57 für die Konversion in einen [4Fe-4S]-Cluster weiter (Banci et al, 2014). Es wäre also möglich, dass die Cysteinliganden von Apo-[4Fe-4S]-Proteinen in Zellen mit Defekten in der späten ISC-Maschinerie durch die instabile Inkorporation eines [2Fe-2S]-Clusters zugänglich gemacht werden. Alternativ könnte ein noch nicht identifiziertes Enzym die Polysulfidmodifikation unmittelbar vor der Insertion des [4Fe-4S]-Clusters entfernen. Per- oder Polysulfide können mit Reduktionsmitteln wie Glutathion entfernt werden (Mishanina et al, 2015; Requejo et al, 2010). Katalysiert werden diese Reaktionen im Allgemeinen von Glutaredoxinen und Thioredoxinen (Berndt et al, 2008). Insofern könnte das Glutaredoxin Grx5 durchaus die hier beobachtete Persulfidmodifikation von Apo-Fe/S-Proteinen entfernen und damit die nachfolgende Insertion eines

Fe/S-Clusters ermöglichen. Zumindest im Fall von [4Fe-4S]-Proteinen muss es dann jedoch mindestens ein redundantes Glutaredoxin oder Thioredoxin geben, welches die Cysteinliganden dieser Proteinklasse in Δ grx5-Zellen zugänglich macht. Es bleibt zu ermitteln, welche enzymatischen Systeme an der Einführung und der Entfernung dieser Cysteinpolysulfide beteiligt sind.

Teilprojekt II: Analyse der Interaktionsdynamik der Teilkomponenten der späten ISC-Maschinerie mit Hilfe eines *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems

Das zweite Teilprojekt der vorliegenden Dissertation beschäftigt sich mit der Maturierung von Fe/S-Zielproteinen durch die späten Komponenten der ISC-Maschinerie: Isa1, Isa2 und Iba57. Um weitere Einblicke in den bisher unbekannten Prozess der von diesen Proteinen katalysierten Fe/S-Cluster-Konversion zu erhalten, sollten die binären Interaktionen von Isa1, Isa2 und Iba57 untereinander und mit weiteren Komponenten der ISC-Maschinerie betrachtet werden. Am Anfang dieser Untersuchung stand daher zunächst die Fragestellung, welches Testsystem am besten geeignet wäre, um systematisch Protein-Protein-Interaktionen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* zu analysieren. Das letztlich in dieser Arbeit entwickelte *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem zählt zu den Protein-Fragment-Komplementationssystemen und stellt eine Möglichkeit dar, Protein-Protein-Interaktionen systematisch *in vivo* und sogar *in organello* zu analysieren (Michnick et al, 2007). In der Literatur finden sich diverse Anwendungsbeispiele derartiger Testsysteme, welche sich aus nahezu allen bekannten Enzymklassen zusammensetzen (Michnick et al, 2007). Im Folgenden sollen kurz die Gründe nahegelegt werden, die hier zu der Entwicklung eines neuen Testverfahrens für die systematische Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* führten. Vor allem die in Mitochondrien bereits etablierten Protein-Fragment-Komplementationssysteme, welche auf die Reassemblierung fluoreszierender Proteine setzen, haben den Nachteil, dass man mit Ihnen auf Grund der Irreversibilität und der Dauer der Bildung des Chromophors keine Dynamik messen kann (Hida et al, 2009; Magliery et al, 2005). Enzymbasierte Split-Systeme zeigen hingegen oft eine schnelle Dynamik, da sie ihr Substrat nur transient binden und enzymatisch umsetzen. Im Prinzip stellt das hier vorgestellte *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem daher eine echte Verbesserung gegenüber den ansonsten häufig verwendeten Protein-Fragment-Komplementationssystemen mit fluoreszierenden Proteinen dar. Eine weitere Möglichkeit der systematischen Analyse von Protein-Protein-Interaktionen ist das „Yeast two Hybrid“-Testverfahren (Fields & Song, 1989), welches in der Vergangenheit bereits äußerst erfolgreich für diese Aufgabe in unterschiedlichen Zellsystemen genutzt wurde. Das Testverfahren ist sehr leistungsstark für cytosolische Proteine (Bruckner et al, 2009). Mit der gegebenen Fragestellung in der vorliegenden Dissertation, nämlich der systematischen Analyse von Protein-Interaktionen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae*, kommt man hier jedoch an eine Grenze des technisch Machbaren. Die besonderen

physikochemischen Eigenschaften von Zellorganellen, vor allem die pH-Unterschiede, machen eine Analyse des physiologischen Interaktionsverhaltens von Proteinen aus diesen Zellkompartimenten mit einem „Yeast two Hybrid“ äußerst Artefakt anfällig (Bruckner et al, 2009). Diese technische Limitierung ist seit langem bekannt und führte daher unter anderem zu der Entwicklung des sogenannten BioID-Testverfahrens (proximity-dependent biotin identification) (Roux et al, 2012). Die genannte Methode hat zudem den Vorteil, dass sie dazu genutzt werden kann, zeitgleich ganze Interaktionsnetzwerke zu identifizieren, wohingegen „Yeast two Hybrid“-Testsysteme lediglich binäre Protein-Protein-Interaktionen analysieren können. Auf der anderen Seite ist gerade dieser Umstand auch eine der größten Schwächen von Techniken wie BioID oder „affinity-capture complex purification“. Vor allem in Organellen wie den Mitochondrien, in denen Proteine besonders stark konzentriert sind, kommt es zur Identifikation vieler falsch positiver Interaktionspartner. Zudem sind beide Methoden mit einem hohen technischen Aufwand verbunden. Insbesondere auch bei der Immunpräzipitation von Proteinkomplexen treten oft zusätzliche Probleme bei der Analyse von Organellen auf. In der Regel wird hierbei für ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis auf eine mehrfache Affinitätsreinigung zurückgegriffen. Hierzu eignet sich z.B. das TAP-Tag (tandem-affinity purification), welches eine hohe Reinheit gewährleistet (Puig et al, 2001). Die enorme Größe dieses Tags macht es jedoch schwierig, dieses an unterschiedliche Proteine zu fusionieren ohne deren Lokalisation, Funktion oder Proteinstabilität zu stören (Gavin et al, 2002).

Vor diesem Hintergrund an technischen Möglichkeiten stellte sich das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem als eine vielversprechende Methodik dar, um dynamische Protein-Protein-Interaktionen in Mitochondrien verhältnismäßig günstig und zügig zu analysieren. Das in dieser Arbeit etablierte Testsystem beruht auf der artifiziellen Zweiteilung der Luciferase aus *Renilla reniformis* (hRluc) zwischen Aminosäureposition 229 und 230 in eine N-terminale-Domäne (NTD) von ca. 25 kDa und eine kleinere C-terminale hRluc-Domäne (CTD) von ca. 9 kDa. Die enzymatisch inaktiven Domänen werden jeweils C-terminal über einen (GGGS)₂-Linker an zwei Zielproteine fusioniert (Abb. 2.2 und 2.3.1). Hierfür wurden drei integrative Hefektoren konstruiert: pUG73 NTD-hRluc, pFA6a-kanMX4 NTD-hRluc sowie pUG72 CTD-hRluc (Abb. 4.3.1). Diese Vektoren enthalten jeweils die indizierte hRluc-Domäne in Form von DNA-Kassetten sowie einen vom Plasmidrückgrat definierten Selektionsmarker. Mit diesen Vektoren ist es in der Theorie möglich, jedes beliebige Hefegen genomisch am 3'-Ende mit einer hRluc-Domäne über somatische Rekombination zu fusionieren (Abb. 2.3.1). Es wurde zudem zusätzlich ein Plasmid basiertes Testsystem zur Überexpression von hRluc-Fusionsproteinen in verschiedenen Kompartimenten der Bäckerhefe entwickelt aber hier noch nicht getestet (Abb. 4.3.2). Das Plasmid basierte Testsystem eignet sich für Protein-Protein-Interaktionsstudien unter Überexpression der Proteine und könnte zukünftig für Interaktionsstudien von äußerst niedrig abundanten Proteinen in der Zelle genutzt werden.

Etabliert wurde das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem zunächst an bekannten Komponenten der mitochondrialen späten ISC-Maschinerie: Isa1, Isa2 und Iba57 (Abb. 2.4.1). Tatsächlich konnten die bereits publizierten binären Interaktionen zwischen diesen drei Komponenten der späten ISC-Maschinerie mit der *Renilla* Split-Luciferase-Technik bestätigt werden (Gelling et al, 2008; Muhlenhoff et al, 2007; Sheftel et al, 2012). Zusätzlich konnten mit dieser Technik erstmalig Hinweise auf die Existenz eines trimeren Komplexes der Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 *in vivo* gefunden werden (Abb. 2.5). Die gewonnenen Daten zeigen, dass sich das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem grundsätzlich in der mitochondrialen Matrix verwenden lässt und mit anderen Techniken vergleichbare Ergebnisse zum Interaktionsverhalten zweier Proteine liefert. Der Großteil der hier untersuchten Komponenten der ISC-Maschinerie zählt zu den niedrig abundanten Proteinen innerhalb der mitochondrialen Matrix (Ghaemmaghami et al, 2003). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte es sich heraus, dass die endogene Fusion einer der hRluc-Domänen an stark abundante Proteine wie Nfu1, Idh1 oder Idh2 zur unspezifischen Autoassemblierung der Teildomänen in Mitochondrien führt (Abb. 2.7.3). Umgekehrt können die Interaktionen von äußerst schwach exprimierten Proteinen wie Yal044w-a (Bol1) und Yal046c (Bol3) nicht mehr detektiert werden. Generell legen die Daten den Schluss nahe, dass sich das System in den Mitochondrien vor allem für die Analyse der Interaktion von Proteinen mit einem mittleren Expressionslevel von 1500 - 6000 Molekülen pro Zelle eignet. In der vorliegenden Dissertation konnten jedoch auch erfolgreich Proteine mit deutlich niedrigeren (Isa1 mit 125 Molekülen pro Zelle) oder höheren (Yah1 mit 14800 Moleküle pro Zelle) Expressionsleveln in der mitochondrialen Matrix untersucht werden (Ghaemmaghami et al, 2003). Letztendlich hängt die Nutzbarkeit des *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems somit vor allem davon ab, ob und mit welcher Art von hRluc-Domäne das zu untersuchende Proteinpaaar fusioniert werden kann.

Im Prinzip eröffnet die *Renilla* Split-Luciferase-Technik die Möglichkeit, Dynamiken in der Interaktion zweier Proteine zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde das etablierte Testsystem dazu genutzt, nähere Einblicke in die Dynamik der binären Interaktionen zwischen zum einen Isa1, Isa2 und zum anderen Isa1, Iba57 zu erhalten (Abb. 2.6.1 und Abb. 2.6.3). Tatsächlich wurde die Interaktion von Isa1 und Iba57 nur in Zellen mit einer intakten ISC-Maschinerie beobachtet, die Depletion einer weiteren ISC-Komponente führte zum Interaktionsverlust beider Proteine. Im Gegensatz dazu blieben die beiden späten ISC-Komponenten Isa1 und Isa2 in Zellen mit ISC-Defekten zumindest teilweise in einem Subkomplex assoziiert. Diese Daten sprechen für eine funktionelle Assemblierung des Isa1, Isa2, Iba57-Komplexes in den Mitochondrien von *S. cerevisiae*, wobei Isa1 und Isa2 in einem statischen Subkomplex assembliert sind. Auf den ersten Blick erscheint das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem somit gut geeignet für die Analyse von dynamischen Protein-Protein-Interaktionen in Mitochondrien. Neben dem Interaktionsverlust wurde jedoch zusätzlich ein proteolytischer Abbau

der hRluc-Fusionsproteine in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie beobachtet. Da dies mit den unfusionierten Proteinen nicht zu beobachten war, scheint sich die Fusion mit einer hRluc-Domäne destabilisierend auf das Fusionsprotein auszuwirken. Dieser negative Aspekt des *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems wird in der Literatur nicht für das Cytosol beschrieben (Paulmurugan & Gambhir, 2003). In Mitochondrien hingegen ist das Split-hRluc-System somit nur bedingt für die Analyse von dynamischen Protein-Protein-Wechselwirkungen geeignet. Soll es hier dennoch zu diesem Zweck verwendet werden, so müssen zwingend die Expressionslevel der einzelnen hRluc-Fusionsproteine bestimmt werden.

In der vorliegenden Dissertation wurde das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem weiterhin dazu genutzt, die Interaktionen der Komponenten der späten ISC-Maschinerie Isa1, Isa2 und Iba57 mit Grx5, Ssq1, Yah1, Nfu1 sowie Yal044w-a (Bol1) und Yal046c (Bol3) systematisch zu charakterisieren. Es ist wenig bekannt über den molekularen Mechanismus der Fe/S-Cluster-Konversion noch über die Summe aller Interaktionspartner der späten ISC-Maschinerie. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchung für die einzelnen Proteine behandelt.

1. Interaktionen von Grx5 mit dem Isa1, Isa2, Iba57-Komplex:

Nach dem gegenwärtigen Modell der ISC-Maschinerie überträgt das Glutaredoxin Grx5 seinen [2Fe-2S]-Cluster direkt an Fe/S-Zielproteine oder reicht diesen weiter an die späte ISC-Maschinerie, wobei Grx5 seinen Fe/S-Cluster unmittelbar von Isu1 über das Hsp70-Typ Chaperon Ssq1 und sein Kochaperon Jac1 erhält (Banci et al, 2014; Lill et al, 2012; Uzarska et al, 2013). Die Daten in der vorliegenden Arbeit deuten auf eine direkte Interaktion von Grx5 mit Isa1 und Isa2 hin (Abb. 2.7.1). Ssq1 interagiert ebenfalls mit Isa1 und Isa2, die gemessene Luciferaseaktivität fiel jedoch deutlich schwächer aus. Dies lässt auf eine indirekte Interaktion des Chaperons mit den späten ISC-Faktoren, evtl. vermittelt durch Grx5, schließen. Es könnte aber auch sein, dass das Hsp70-Typ Chaperon unspezifisch an diese Proteine bindet. Für eine direkte Interaktion von Ssq1 mit einer der späten ISC-Komponenten gibt es keine Hinweise in der Literatur, und mechanistisch ist sie äußerst unwahrscheinlich. Die Interaktion von Grx5 mit Isa1 und Isa2 konnte hingegen ebenfalls anderweitig *in vivo* mit einem Split Venus-Testsystem beobachtet werden (Kim et al, 2010; Ohashi & Mizuno, 2014), und ein Yeast two-Hybrid in *S. cerevisiae* lieferte weitere Indizien für eine Interaktion von Grx5 mit Isa1 (Vilella et al, 2004). Mit dem *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem konnte jedoch keine Interaktion zwischen Iba57 und Grx5 oder Ssq1 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung überrascht, da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte, dass Iba57 einen trimeren Komplex mit Isa1 und Isa2 bildet (Abb. 2.7.1). In der Literatur gibt es keine Daten bezüglich der Interaktionspartner von Iba57. Ob somit Grx5 neben Ssq1 ausschließlich mit den beiden Isa-

Proteinen interagiert nicht jedoch mit Iba57, sollte mit einer weiteren unabhängigen Analyseverfahren überprüft werden.

2. Interaktionen von Yah1 mit dem Isa1, Isa2, Iba57-Komplex:

Eine weitere zu klärende Frage beinhaltet die Rolle von Yah1 innerhalb der ISC-Maschinerie (Lill et al, 2012). Yah1 stellt Elektronen für die *de novo* Biogenese eines [2Fe-2S]-Clusters bereit und interagiert hierfür mit Isu1 (Alves et al, 2004; Muhlenhoff et al, 2003; Webert, 2011). Es ist durchaus denkbar, dass der Prozess der Fe/S-Cluster-Konversion durch die späte ISC-Maschinerie ebenfalls Reduktionsäquivalente in Form von Elektronen benötigt und hierzu mit Yah1 interagiert. Bisher entzog sich die Beantwortung dieser Fragestellung technisch bedingt einer Analyse, da eine Depletion von Yah1 ultimativ in Apo-Isu1 resultiert. Als primärer Phänotyp lässt sich folglich nur ein Defekt der Kern-ISC-Maschinerie nachweisen, mögliche Einflüsse von Yah1 auf die späte ISC-Maschinerie werden maskiert. Das *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem lieferte erstmalig Indizien für eine Interaktion von Yah1 mit Isa1, Isa2 und Iba57 (Abb. 2.7.2). Für die Spezifität dieser Interaktion spricht, dass weder eine Interaktion von Yah1 mit den Fe/S-Zielproteinen Bio2, Sdh2 und Lip5 noch mit dem Kochaperon Jac1 nachweisbar war (Abb. 2.7.2). Eine Interaktion von Yah1 mit diesen Proteinen ist auszuschließen. Die Daten müssen jedoch trotzdem, wie bereits diskutiert, unbedingt mit einer weiteren Methode verifiziert werden. Sollte Yah1 tatsächlich spezifisch mit den späten ISC-Komponenten interagieren, so wäre dies der erste Hinweis auf einen reduktiven Prozess innerhalb der Fe/S-Cluster-Konversion. Yah1 zeigte im Rahmen dieser Dissertation ebenfalls keine Interaktion mit Isu2. In Hefe interagiert Yah1 jedoch mit dem Paralog Isu1 (Webert, 2011). Die hRluc-Domänen könnten während der Interaktion von Yah1 mit Isu2 sterisch voneinander abgeschirmt werden.

3. Interaktionen von Nfu1 sowie den BolA-ähnlichen Proteinen mit dem Isa1, Isa2, Iba57-Komplex:

Für Yal046w-a (Bol1) wird eine Funktion als Rekrutierungsfaktor für Grx5 an die Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 vermutet (Roret et al, 2014) und auch Yal046c (Bol3) wird eine Rolle innerhalb der späten ISC-Maschinerie zugeschrieben (Cameron et al, 2011; Haack et al, 2013). Mit Hilfe der *Renilla* Split-Luciferase-Technik sollten diese beiden Interaktionen mit der späten ISC-Maschinerie untersucht werden. Auf Grund der niedrigen Expressionsstärke der beiden BolA-ähnlichen Proteine in Hefe konnte jedoch keine Luciferaseaktivität der Fusionsproteine ermittelt werden. Einen Ausweg aus dieser technischen Limitierung könnte eine Plasmid basierte Überexpression der Bol-hRluc-Fusionsproteine mit Hilfe der Vektoren in Abb. 4.3.2 in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* liefern.

Nfu1 ist ein spezialisierter Assemblierungsfaktor für die Maturierung einzelner Zielproteine (Navarro-Sastre et al, 2011). Einblicke in das Interaktionsnetzwerk von Nfu1, insbesondere auch mit den späten ISC-Proteinen Isa1, Isa2 und Iba57, sind von entscheidender Bedeutung, um die Funktion von

Nfu1 und damit auch den Phänotyp von Nfu1-assoziierten Krankheiten zu verstehen (Navarro-Sastre et al, 2011; Tonduti et al, 2015). Die starke Expression der Nfu1-Fusionsproteine und die damit verbundene konzentrationsabhängige Assemblierung der hRluc-Domänen verhinderte allerdings die detaillierte Analyse der Nfu1-Interaktionen mit der *Renilla* Split-Luciferase-Technik. Um dennoch Informationen über Nfu1-Interaktionen zu erhalten, könnten Nfu1-hRluc-Fusionsproteine in Zukunft unter der Kontrolle eines schwachen Promotors Plasmid basiert in Δ nfu1-Zellen exprimiert werden.

Zukünftig sollte das hier für Hefe etablierte *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem auch im Cytosol ausgetestet werden. Hier wurde ein ähnliches Testsystem bereits erfolgreich von anderen Gruppen etabliert und genutzt (Fujikawa & Kato, 2007; Huang et al, 2010; Paulmurugan & Gambhir, 2003). Die konzentrationsabhängige Assemblierung der hRluc-Domänen könnte ein Problem sein, welches lediglich unter den speziellen physikochemischen Bedingungen der Mitochondrien auftritt (Fujikawa & Kato, 2007; Paulmurugan & Gambhir, 2003). Das hier beschriebene *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem erlaubt theoretisch, jedes beliebige Hefegen genomisch am 3'-Ende über somatische Rekombination mit einer hRluc-Domäne zu fusionieren. Es gibt jedoch ein paar Limitierungen zu dieser Methode: (1) Nicht jedes Protein lässt sich C-terminal erfolgreich mit einer hRluc-Domäne fusionieren. (2) Hohe Expressionslevel der Fusionsproteine können in Mitochondrien zu falsch positiven Messergebnissen durch konzentrationsabhängige Autoassemblierung der hRluc-Domänen führen. (3) Die hRluc-Domäne kann sich destabilisierend auf das Fusionsprotein auswirken, was insbesondere die Analyse von dynamischen Protein-Protein-Interaktionen erschwert. (4) Es besteht folglich ein Bedarf an strikten Kontrollen der Messergebnisse und einer unabhängigen Bestätigung der ermittelten Protein-Protein-Interaktionen mit einer weiteren Testmethode. Daher eignet sich das Testsystem nicht für einen automatisierten, genomweiten Screening-Ansatz. Dennoch konnte die Methode in der vorliegenden Arbeit erfolgreich dazu genutzt werden, einige neue Einblicke in die Interaktionen der späten ISC-Komponenten Isa1, Isa2 und Iba57 zu bekommen. So konnte erstmalig *in vivo* gezeigt werden, dass diese drei Proteine einen trimeren Komplex formen, dessen Assemblierung abhängig zu sein scheint von einer funktionierenden ISC-Maschinerie (Abb. D2, grüner Komplex). Zudem konnte eine bereits mit zwei weiteren Techniken publizierte Interaktion zwischen den Proteinen Isa1, Isa2 und Grx5 bestätigt werden (Abb. D2, hellorangener Komplex). Außerdem wurden erstmalig Indizien für eine Interaktion von Yah1 mit Isa1, Isa2 und Iba57 gefunden (Abb. D2, dunkelorangener Komplex). Diese vorläufigen Daten müssen jedoch unbedingt mit mindestens einer unabhängigen Methode verifiziert werden. Sollte es sich herausstellen, dass Yah1 tatsächlich mit Isa1, Isa2 und Iba57 interagiert, so bedeutet dies, dass der Prozess der Fe/S-Cluster-Konversion auf die Versorgung mit Reduktionsäquivalenten in Form von Elektronen angewiesen ist. Dies würde einen neuen Einblick in den zugehörigen Reaktionsmechanismus erlauben.

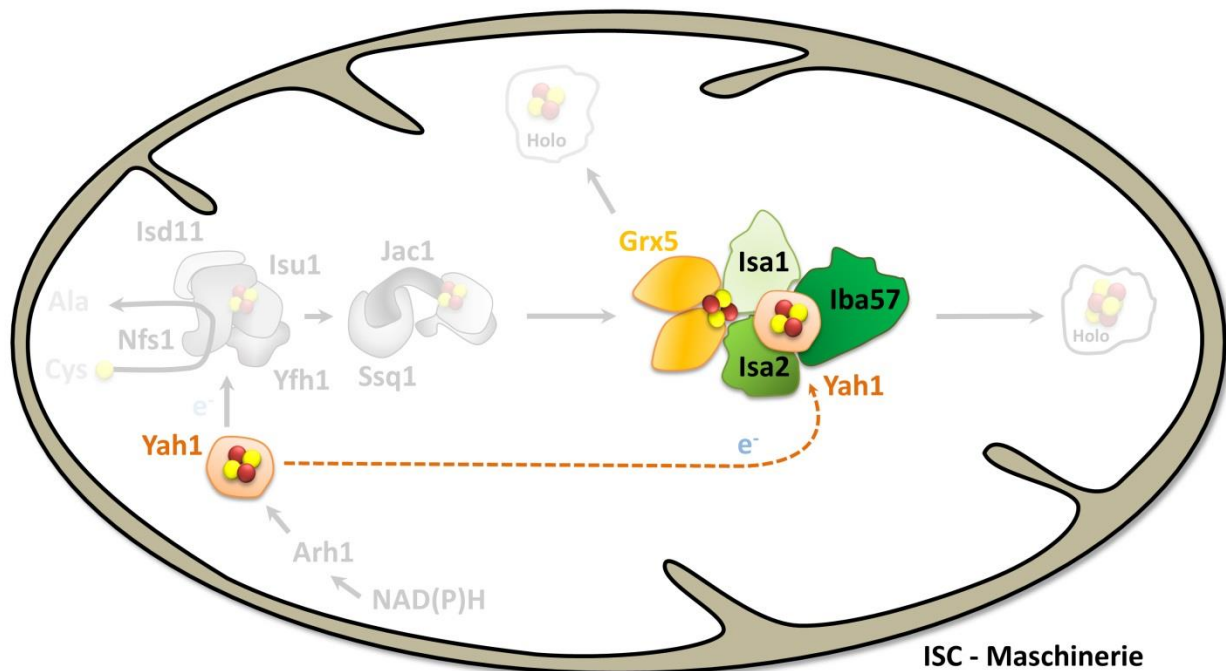


Abbildung D2 Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der späten ISC-Maschinerie. Mit Hilfe der *Renilla* Split-Luciferase-Technik wurde ein trimere Komplex der Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 *in vivo* nachgewiesen. Die Interaktion von Iba57 und Isa1 war hierbei abhängig von einer funktionierenden ISC-Maschinerie, wohingegen die Proteine Isa1 und Isa2 einen statischen Subkomplex in Zellen mit Defekten in der ISC-Maschinerie zu formen schienen. Zusätzlich wurde eine Interaktion von Grx5 mit Isa1 und Isa2, nicht jedoch mit Iba57 *in vivo* beobachtet. Zudem lieferte das Split-hRLuc-System Indizien für eine spezifische Interaktion des mitochondrialen Ferredoxin Yah1 mit allen drei späten ISC-Komponenten: Isa1, Isa2 und Iba57. Im Hinblick auf die Limitationen des Testsystems sollten die hier beschriebenen Interaktionen mit einer weiteren Methode verifiziert werden.

Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, waren die verwendeten Chemikalien vom Reinheitsgrad *pro analysi* (p. a.) oder für biochemische Zwecke ausgelegt.

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Aminosäuren	Merck, Sigma Aldrich, Roth, AppliChem
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Bradfordreagenz	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Cis Aconitat	Sigma Aldrich, München
Citratpuffer	Roth, Karlsruhe
Complete Inhibitor Mix, 50x	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Cleavable ICAT® Reagent Bulk Kit	AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt
Cleavable ICAT® Reagent-Methods Development Kit	AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt
Cystein	Merck, Darmstadt
Cytochrome C	Sigma Aldrich, München
D + Glucose-Monohydrat	AppliChem, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dithiothreitol, DTT	Roth, Karlsruhe
DMF, Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
DNA-Molekulargewichtsstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Dodecylmaltosid	Roth, Karlsruhe
EDTA	Acros Organics, Geel, Belgien
Eisenammoniumzitat	Sigma Aldrich, München
Ethanol	AppliChem, Karlsruhe
anti-FLAG-M2-Affinitätsgel	Sigma Aldrich, München
FLAG-Peptid	Sigma Aldrich, München
Galactose	Fluka, Steinheim
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas, Waltham, USA
Glasperlen 0,5mm	Kobe, Marburg
Glycerin	Sigma Aldrich, München
α Ha-beads SC-7392 AC	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Hefe Stickstoff Base	Formedium, Norwich, U.K.
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
ICAT kit	AB Sciex, Concord, Kanada
Isopropanol	Acros Organics, New Jersey, USA
Isopropylmalat	Wako pure chemical industries, Osaka, Japan
K ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
KCN	Sigma Aldrich, München

KH₂PO₄	Roth, Karlsruhe
Lachssperma-DNA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Lithium Acetat	Sigma Aldrich, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
MPB-11	EZ Link Thermo Scientific, Waltham, USA
MPB-2	EZ Link Thermo Scientific, Waltham, USA
α Myc-beads SC-40AC	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA
NaCl	Roth, Karlsruhe
NADH	AppliChem, Karlsruhe
NADP+	AppliChem, Karlsruhe
Na-Malonat	Sigma Aldrich, München
Na-Succinat	Sigma Aldrich, München
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Oxalacetat	AppliChem, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, Waltham, USA
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
PEG 4000	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	AppliChem, Karlsruhe
Phusion DNA Polymerase	Finnzymes, Thermo Scientific, Waltham, USA
PicoTip EMITTER, EconoTip	New Objective, Woburn, USA
PMS	Sigma Aldrich, München
Ponceau S	Serva, Heidelberg
PROTRAN® (Nitrozellulose Transfer Membran)	Whatman GmbH, Dassel
<i>Renilla</i>-Juice Luciferase Assay	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
<i>Renilla</i>-Luciferase Assay System	Promega Corporation, Fitchburg, USA
Restriktionsendonukleasen	Fermentas und NEB (New England Biolabs)
Sorbitol	AppliChem, Karlsruhe
T4-DNA Ligase	Fermentas, Waltham, USA
Trichloressigsäure, TCA	Roth, Karlsruhe
TCEP	Sigma Aldrich, München
TNETG	vorhanden
Triethanolamin Hydrochloride	Sigma Aldrich, München
Triton® X-100	Sigma Aldrich, München
TWEEN® 20	Sigma Aldrich, München
Whatman Filterpapier	Whatman International LTD, Maidstone, U.K.
Zymolyase 100T	Seikagaku Biobusiness, Tokyo, Japan
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

4.1.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammern	Horizontal Minigel System	AGS GmbH , Heidelberg
Agarosegelkammern	B1A	Owl Separation Systems , Portsmouth, USA
Autoklav	Systec VX-150	Systec GmbH , Wettenberg
Autoklav	Tuttnauer 5075 ELV	Systec GmbH , Wettenberg
Blot Kammer		PeqLab Biotechnologie , Erlangen
Chemiluminometer	SiriusLTube Luminometer	Titertek Berthold , Huntsville, USA
Eismaschine	AF20	Scotsman , Vernon Hills
Feinwaage	SBC 22	Scaltec , Göttingen
Fluoreszenz-Spektrometer	V-550 UV/Vis Spectrophotometer	Jasco , Groß-Umstadt
Gefrierschrank	Ubest	
	Ultra low Temperature Freezer C760	New Brunswick Scientific , Nürtingen
	innova	
Gefrierschrank	MDF-192 Ultra low	Sanyo , Moriguchi, Osaka
Gefrierschrank	Liebherr Premium ****	Liebherr , Kirchdorf
Gelkamera	Gel iX Imager	Intas Scientific imaging
Heizblock	Liebisch, Type: 50126101	Gebr. Liebisch , Bielefeld
HPLC Komponenten		
HPLC: Detektor	Waters 2487 Dual I Absorbance Detector	Waters , Eschborn
HPLC: Fraktionssammler	Advantec CHF122SC Fraction Collector	Advantec , Dublin, CA
HPLC: Gelfiltrationssäule	Shodex KW-802.5	Showa Denko K. K., Tokyo, Japan
HPLC: Pumpen , 2x	Waters 515 HPLC Pump	Waters , Eschborn
HPLC: Säulenofen	Torrey Pines Scientific CO50	Torrey Pines Scientific Inc., Carlsbad, USA
Inkubator	Steri-cult incubator	Forma Scientific , Göttingen
Inkubator	BE200	Memmert , Schwabach
Kühlschrank	Liebherr profi line	Liebherr , Kirchdorf
Kühlschrank	Liebherr Premium	Liebherr , Kirchdorf
Massenspektrometer	LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrowelle	Privileg 8520	Privileg , Fürth
PCR Maschinen	UNO-Thermoblock	Biometra , Göttingen
PCR Maschinen	Primus 25 advanced	Peqlab , Erlangen
pH-Meter	UB - 10 PH/mV Meter UltraBasic	Denver Instrument , Göttingen
pH-Meter	Lab850	Schott , Stafford, UK
Pipettierhilfen	Pipetman	Gilson , Middleton, USA
Plattenlesegerät	Tecan Infinite M200	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Reinst-Wassersystem	SG / Elix UV5 / Ultraclean	Millipore/SG , Hamburg Barsbüttel
Rührelement	IKAMAG REO	IKA Labortechnik , Staufen
Schüttelinkubator	KS15/TH15	Edmund Bühler , Bodelshausen
Schüttelinkubator	Multitron AJ121	HT Infors AG , Bottmingen, Schweiz
Schüttelinkubator	UNIMAX 1010	Heidolph , Kelheim
Schüttelinkubator	Thermomixer comfort, 1,5ml	Eppendorf , Hamburg
Schüttelinkubator	Thermomixer 5436	Eppendorf , Hamburg
Schüttler	Mixer 5432	Eppendorf , Hamburg
Schüttler	Rocker 25	Labnet international inc , Oakham,

		Russland
Spektrometer	Genesys 20	Thermo Spectronic , Waltham, MA
Spülmaschine	Professional G7883	Miele , Gütersloh
Spülmaschine	Multitronic Mielelabor G7783	Miele , Gütersloh
Sterilbank	BHA48	Nuaire, Baar
Sterilbank	NU-437-400E BJ09/09	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Sterilisator	UM 700	Memmert , Nürnberg
Stromquelle	EPS601	Amersham pharmacia , Freiburg
Stromquelle	EPS600	Pharmacia Biotech , Uppsala, Schweden
Stromquelle	EC105	E-C Apparatus Corporation , Philadelphia, USA
Szintilationszähler	LS6500 Multi-Purpose Szintilation counter	Beckman Coulter , Brea, Kalifornien
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus Instruments , Hanau
Tischzentrifuge	Fresco 17	Thermo Scientific , Waltham, USA
Überkopfwender	Reax 2	Heidolph , Kelheim
UV-Illuminator	FLX-20L	Peqlab , Erlangen
Vortex	Vortex-Genie2	Scientific Industries , Bohemia, N.Y., USA
Waage	PT 1500	Sartorius , Göttingen
Waage	1212 MP	Sartorius , Göttingen
WB-Kamera	Chemostar Professional	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
WB-Schüttler	KL2	Edmund Bühler , Bodelshausen
WB-Schüttler	UNI MAX 1010	Heidolph , Kelheim
Wippe	Rocker 25	Labnet international inc , Oakham, Russland
Zentrifuge	Avanti J-26XP centrifuge	Beckman Coulter , Brea, Kalifornien
Zentrifuge	Avanti J-20XP centrifuge	Beckman Coulter , Brea, Kalifornien
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf , Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments , Hanau

4.2 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Herstellungsmethode	Quelle	Depletion
W303-1A	MATa; <i>ade 2-1, his 3-11,15, leu 2-3,112, trp 1-1, ura 3-1, can 1-100</i>		(Mortimer & Johnston, 1986)	-
Gal ARH1	W303-1A; <i>pARH1::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Pierrel et al, 2010)	40h
Gal ARH1 / <i>rdl1Δ</i> / <i>rdl2Δ</i>	W303-1A; <i>pARH1::GAL1-10-HIS3; rdl1-2Δ::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal; pFA6a-KanMX4)	diese Arbeit	40h
Gal ARH1 / <i>tum1Δ</i> / <i>rdl1Δ</i> / <i>rdl2Δ</i>	W303-1A; <i>pARH1::GAL1-10-HIS3; rdl1-2Δ::kanMX4; tum1Δ::natNT2</i>	PCR Fragmente (pFA6a-HIS3-Gal; pFA6a-KanMX4; pFA6a-natNT2)	diese Arbeit	40h
Gal CIA1	W303-1A; <i>pydr267C::(Gal1-10)-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Balk et al, 2005)	64h
Gal GRX5	W303-1A, <i>pGRX5::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff et al, 2003)	64h
Gal IBA57	W303-1A; <i>pIBA57::GAL-L-natNT2</i>	PCR Fragment (pYM-N27)	(Gelling et al, 2008)	40h
Gal ISA1	W303-1A; <i>pISA1::(Gal1-10)-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff et al, 2007)	64h
Gal JAC1	W303-1A; <i>pJAC1::(Gal1-10)-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff et al, 2003)	64h
Gal NAR1	W303-1A, <i>pNAR1::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Balk et al, 2004)	40h
Gal NBP35	W303-1A, <i>pNBP35::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Hausmann et al, 2005)	40h
Gal NFS1	W303-1A, <i>pNFS1::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff et al, 2003)	40h
Gal SSQ1	W303-1A; <i>pSSQ::(Gal1-10)-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff et al, 2003)	64h
Gal YAH1	W303-1A; <i>pYAH1::(Gal1-10)-Leu2</i>	PCR Fragment (pUG73)	(Lange et al, 2000)	40h
GalL GRX4 / <i>grx3Δ</i>	W303-1A, <i>pGRX4::GAL-L-natNT2; grx3Δ::LEU2</i>	PCR Fragmente (pYM-N27; pUG73)	(Muhlenhoff et al, 2010)	40h
<i>aco1Δ</i>	W303-1A <i>aco1::HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3MX6)	(Gelling et al, 2008)	-
<i>grx5Δ</i>	W303-1A; <i>grx5Δ::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a-KanMX4)	(Rodriguez-Manzanique et al, 1999)	-
<i>iba57Δ</i>	W303-1A; <i>iba57Δ::natNT2</i>	PCR Fragment (pYM-N27)	(Gelling et al, 2008)	-
<i>isa1Δ</i>	W303; <i>isa1Δ::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a-KanMX4)	(Kaut et al, 2000)	-
<i>isa2Δ</i>	W303; <i>isa2Δ::HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-rHIS3)	(Pelzer et al, 2000)	-
<i>rdl1Δ</i> / <i>rdl2Δ</i>	W303-1A; <i>rdl1-2Δ::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a-KanMX4)	diese Arbeit	-
<i>rip1Δ</i>	W303-1A; <i>rip1Δ::Leu2</i>	PCR Fragment (pUG73)		-
<i>tum1Δ</i>	W303-1A; <i>tum1Δ::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a-KanMX4)	diese Arbeit	-
<i>tum1Δ</i> / <i>rdl1Δ</i> / <i>rdl2Δ</i>	W303-1A; <i>rdl1-2Δ::kanMX4; tum1Δ::natNT2</i>	PCR Fragment (pFA6a-KanMX4; pFA6a-natNT2)	diese Arbeit	-
<i>met5Δ</i>	W303-1A; <i>met5Δ::natNT2</i>	PCR Fragment (pFA6a-natNT2)	diese Arbeit	-
<i>cys3Δ</i>	W303-1A; <i>cys3Δ::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a-KanMX4)	diese Arbeit	-

<i>met5Δ</i> , <i>cys3Δ</i>	W303-1A; <i>met5Δ::natNT2</i> ; <i>cys3Δ::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a- <i>natNT2</i> ; pFA6a-KanMX4)	diese Arbeit	-
<i>met5Δ</i> , <i>cys4Δ</i>	W303-1A; <i>met5Δ::natNT2</i> ; <i>cys4Δ::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a- <i>natNT2</i> ; pFA6a-KanMX4)	diese Arbeit	-

Tabelle 4.2 Details zu den in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämmen, Teilprojekt I.

Eine Liste aller generierten Hefestämme im Zusammenhang mit Teilprojekt II, der Etablierung eines *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems in den Mitochondrien von *S. cerevisiae*, ist dem Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

4.3 Liste der verwendeten Plasmide

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurden einzelne Gene mittels PCR basierter Methoden in 426- und 416-2μ-Plasmide eingeführt. Die Arbeiten wurden ausgeführt gemäß (Funk et al, 2002; Janke et al, 2004).

Plasmid	ORF	Promotor (bp)	Rückgrad	Quelle
p426-F1β BFD-FLAG	<i>Bfd</i> (E. coli); C-terminales FLAG-tag	TDH3	p426- <i>TDH3</i>	diese Arbeit
p426-F1β BFD-Myc	<i>Bfd</i> (E. coli); C-terminales Myc-tag	TDH3	p426- <i>TDH3</i>	(Christ, 2011)
p425-F1β HIPIP-FLAG	<i>HIPIP</i> (A. vinosum); C-terminales FLAG-tag	TDH3	p425- <i>TDH3</i>	diese Arbeit
p426-F1β HIPIP-FLAG	<i>HIPIP</i> (A. vinosum); C-terminales FLAG-tag	TDH3	p426- <i>TDH3</i>	diese Arbeit
p426-F1β HIPIP-L-3xFLAG	<i>HIPIP</i> (A. vinosum); C-terminales triple FLAG-tag + Linker	TDH3	p426- <i>TDH3</i>	diese Arbeit
p426-F1β HIPIP-L-FLAG	<i>HIPIP</i> (A. vinosum); C-terminales FLAG-tag + linker	TDH3	p426- <i>TDH3</i>	diese Arbeit
p426-F1β HIPIP-Myc	<i>HIPIP</i> (A. vinosum); C-terminales Myc-tag	TDH3	p426- <i>TDH3</i>	(Muhlenhoff et al, 2011)
p426-F1β HIPIP-Strep	<i>HIPIP</i> (A. vinosum); C-terminales Strep-tag	TDH3	p426- <i>TDH3</i>	diese Arbeit
p426-HIPIP-Myc	<i>HIPIP</i> (A. vinosum); C-terminales Myc-tag	TDH3	p424- <i>TDH3</i>	(Muhlenhoff et al, 2011)
p424 NTG2-Myc	<i>NTG2</i> (S. cerevisiae); C-terminales Myc-tag	TDH3	p424- <i>TDH3</i>	(Christ, 2011)

Tabelle 4.3 Details zu den in dieser Arbeit verwendeten Plasmiden.

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde ein *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem entwickelt. Hierzu wurden zum einen integrative Hefektoren erstellt, welche eine Fusion der NTD- oder CTD-hRluc an das 3'-Ende eines Hefegens erlauben (Abb. 4.3.1). Zum anderen wurden zusätzlich Vektoren für ein Plasmid basiertes Split-Luciferase-Testsystem entwickelt, welche die Überexpression von hRluc-Fusionsproteinen ermöglichen (Abb. 4.3.2). Für Details zu den Testsystemen siehe Kapitel 2.2 und Kapitel 2.3.

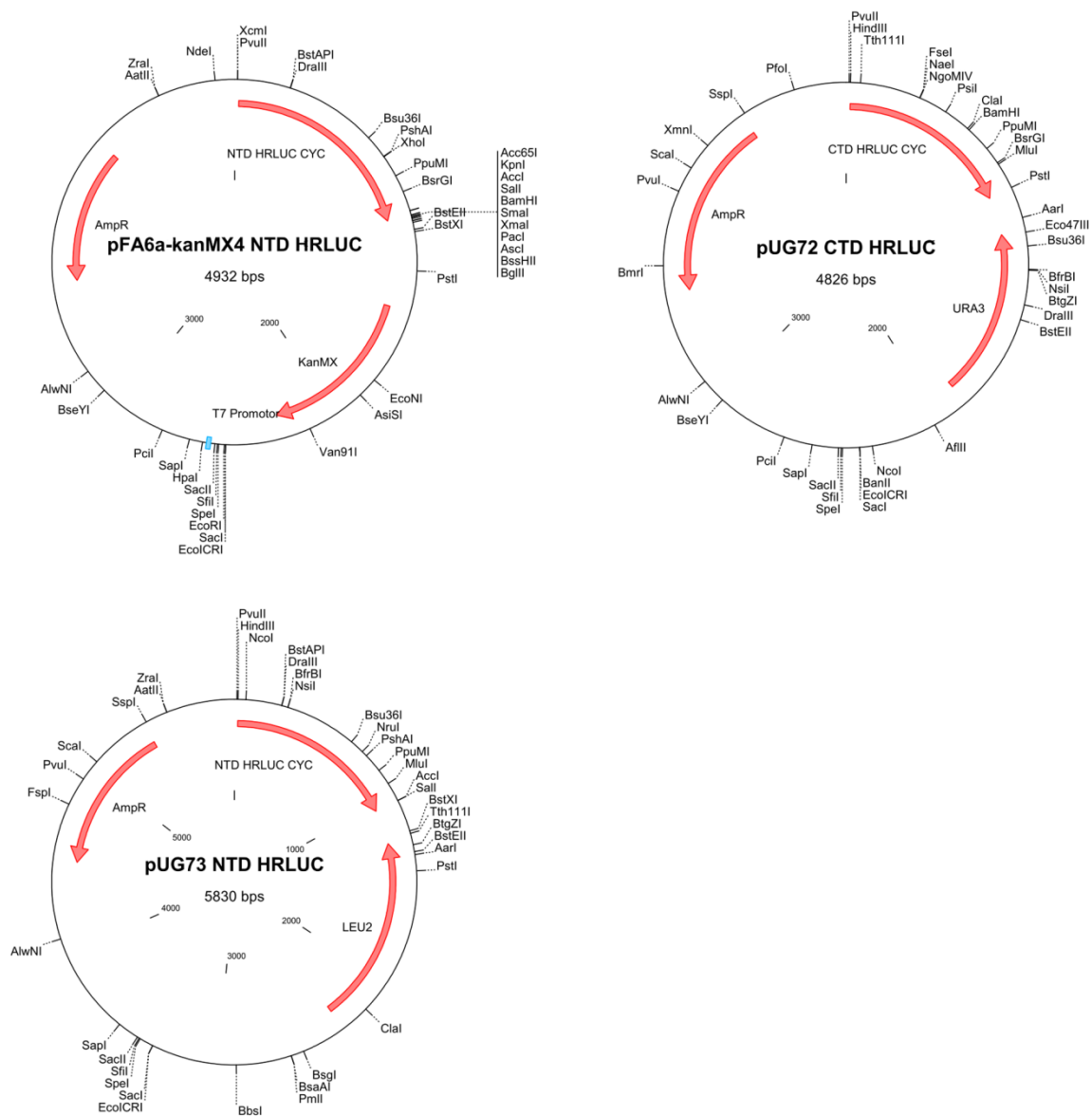


Abbildung 4.3.1 Vektorkarten der Plasmide des Split-Luciferase-Testsystems genutzt für eine genomische Integration der hRluc-Einzeldomänen in das Genom von *S. cerevisiae*. Singuläre Restriktionsschnittstellen, die jeweils integrierte Luciferase-Domäne fusioniert an einen CYC1-Terminator und die zugehörigen Selektionsmarker sind indiziert.

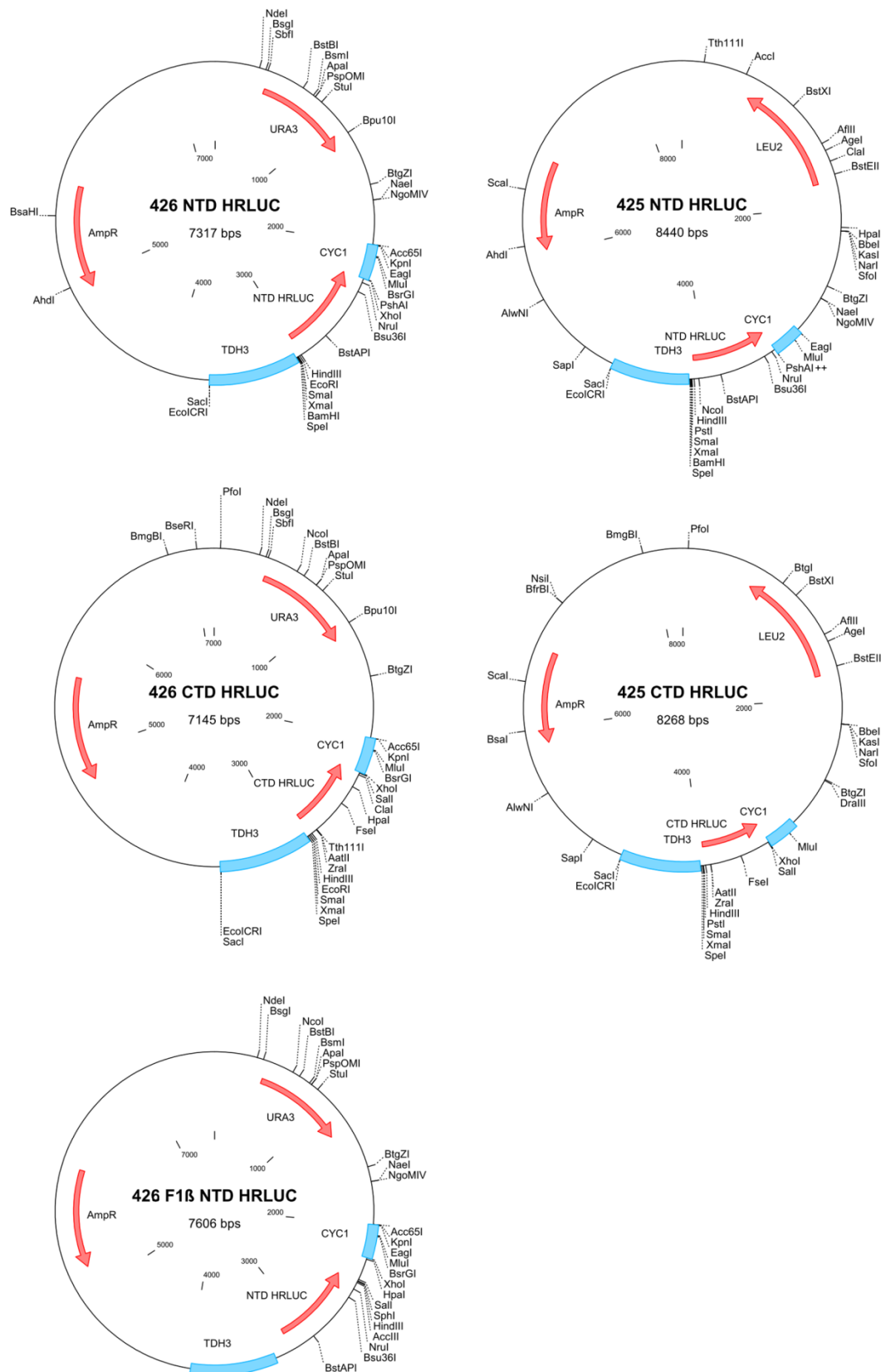


Abbildung 4.3.2 Vektorkarten der 2 μ -Plasmide des Split-Luciferase-Testsystems für eine Plasmid-basierte Überexpression eines Fusionsproteins mit einer Luciferasedomäne in *S. cerevisiae*. Singuläre Restriktionsschnittstellen, die jeweils integrierte Luciferase-Domäne unter der Kontrolle eines TDH3-Promotors und eines CYC1-Terminators sowie die zugehörigen Selektionsmarker sind indiziert. Die F1 β -Zielsequenz des untersten Vektors erlaubt eine mitochondriale Lokalisation des fertigen Fusionsproteins.

4.4 Oligonukleotide zur endogenen Modifikation von Genen in *S. cerevisiae*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden lyophilisiert über die Firma Metabion, München, bezogen. Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 30 Basenpaaren wurden im Anschluss an die Synthese HPLC gereinigt, kürzere Syntheseprodukte wurden lediglich entsalzt.

4.4.1 Teilprojekt I: Defekte in der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierung induzieren eine Cystein-S-Poly-Thiolierung auf Fe/S-Zielproteinen

Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen von Oligonukleotidpaaren aufgeführt, welche für die PCR-basierte Herstellung von DNA-Matrizen für die genomische Deletion der angezeigten Gene in *S. cerevisiae* durch somatische Rekombination genutzt wurden (Sherman, 2002).

Primer	Oligonukleotide (5'→3')	DNA-Matrize
rdl1Δ fw.	5'-CAAAGAATCTTTCTCGTTTATTTTCAGGGTTTGACTAAGAAACGATATTAACGTACGCTGCAGGTCGAC -3'	pFA6a-kanMX4
rdl1Δ re.	5'-CATAATACGTTACTAGCTTACGAAAATACACAGGGTACATACCTAGAGTATACAAGGATCGATGAATTCGAGCTCG -3'	pFA6a-kanMX4
rdl2Δ fw.	5'-GAATAAGATAGCGATAACTCTCAACAAATGGAAGCGAGACAGAAAGAAAAAGACCAACGCGTACGCTGCAGGTCGAC -3'	pFA6a-kanMX4
rdl2Δ re.	5'-CACAAAAGGTTGTCTATATACAGGATATATCGATTACTTGTTCCTTTTGGCATCGATGAATTCGAGCTCG -3'	pFA6a-kanMX4
tum1Δ fw.	5'-CATTCAACAATGAGGACAAAAGCATAAAGTTGTGAAGAAAATTGCCCATACATTCACGTACGCTGCAGGTCGAC -3'	pFA6a-kanMX4 / pFA6a-natNT2
tum1Δ re.	5'-GATAATTAATATATGTAGCTAAATAAATCGACTTGTCAGAATATATTTCTCTTAATCGATGAATTCGAGCTCG -3'	pFA6a-kanMX4 / pFA6a-natNT2
tum1Δ fw.	5'-CATTCAACAATGAGGACAAAAGCATAAAGTTGTGAAGAAAATTGCCCATACATTCATTATTAGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
tum1Δ re.	5'-GATAATTAATATATGTAGCTAAATAAATCGACTTGTCAGAATATATTTCTCTTACCAATACAACAGATCACGTG -3'	pUG72 (URA3)
met5Δ fw.	5'-CTAATAAAGTAACAGTAGGGAACGGGAACAGAGAAAAACAAAAGATTGGCGACGTACGCTGCAGGTCGAC -3'	pFA6a-kanMX4 / pFA6a-natNT2
met5Δ re.	5'-TAAATAAATGTGGGAAGAAAACCAATAGTAGTCTCTACTATGTCATATGCTATCAATCGATGAATTCGAGCTCG -3'	pFA6a-kanMX4 / pFA6a-natNT2
cys3Δ fw.	5'-CACATAGACATTGACCTTATACATATACACACAAGACAAAACCAAAAAAATCGTACGCTGCAGGTCGAC -3'	pFA6a-kanMX4 / pFA6a-natNT2
cys3Δ re.	5'-GATATTTATCGTACTTAAAAAGGTCCGGTCAAGGCAGAGACGTGGCACTGGCGAATCGATGAATTCGAGCTCG -3'	pFA6a-kanMX4 / pFA6a-natNT2
cys4Δ fw.	5'-CGTTGTAGGCCACTTGCTCAAAGGACATCTAGATAAATACGACGTAAGAATAAACGTACGCTGCAGGTCGAC -3'	pFA6a-kanMX4 / pFA6a-natNT2
cys4Δ re.	5'-GGAATGACGGATTTTGCTTCTATGTTTGCTTTTATTGAAGCGTGGGTTCTTATATCGATGAATTCGAGCTCG -3'	pFA6a-kanMX4 / pFA6a-natNT2

Zudem wurden im Verlauf dieser Arbeit zwei Punktmutationen in das Gen HIPIP aus *A. vinosum* im Vektor p426-F1β HIPIP-FLAG (Plasmidliste siehe Kapitel 4.3) mit Hilfe einer Mutagenese-PCR (Zheng et al, 2004) und den folgenden Oligonukleotidpaaren eingeführt.

F1β HIPIP-FLAG Variante	Aminosäureaustausch	Oligonukleotid Paar (5'→3')
C48S-Mutation	C48S	fw: GCA CTC TGCCAA CTG CCA GTT CAT G re: GTT GGC AGA GTG CTG CTC TTC GGG CGG
C68S-Mutation	C68S	fw: GGG CTC TCA GCT CTT CCC CGG CAA G re: GCT GAG AGC CCT TCC ACT CGT CGG TCG C

4.4.2 Teilprojekt II: Etablierung eines Split-Luciferase-Testsystems für Studien der Protein-Protein-Interaktion mitochondrialer ISC-Komponenten

Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen von Oligonukleotidpaaren und die zugehörigen Ausgangs- und Zielvektoren aufgeführt, welche für die PCR-basierte Herstellung der Split-Luciferase-Konstrukte genutzt wurden. Funktionelle Teilbereiche sind farblich kodiert erläutert.

N-terminale Domäne (NTD)					
Produktname	Ausgangsvektor	Primer	Zielvektor	Restriktionsenzyme	
p426 THD3 hRluc-NTD	pGL4.70[hRluc]	fwd: 5'-GTTCCCAAGCTTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGCGGTTCGACCACTGGGCTTCCAAGG-3' rev: 5'-GGACGGCTCGAGTCAGCTCCCTTAACGAGAGG-3'	p426 TDH3	HindIII (N), XhoI (C)	
p425 TDH3 hRluc-NTD	426 NTD hRluc	-	p425 CTD hRluc	SmaI (N), XhoI (C)	
pUG73 hRluc-NTD	p426 THD3 hRluc-NTD	fwd: 5'-AACACCAGAACTTAGTTTCG-3' rev: 5'-GGCAGCGCTCGACGAAGGCTTTAATTTCGGG-3'	pUG73	HindIII (N), SalI (C)	
pFA6a kanMX4 hRluc-NTD	pUG73 hRluc-NTD	-	pFA6a kanMX4	PvuII (N), SalI (C)	
C-terminale Domäne (CTD)					
Produktname	Ausgangsvektor	Primer	Zielvektor	Restriktionsenzyme	
p425 THD3 hRluc-CTD	416Met25 hRluc-CYC1	fwd: 5'-GTTCCCAAGCTTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGCGGTTCaAGCCCGAGTCGTCCTCAG-3' rev: 5'-CGTGAATGTAAGCGTGACATAAC-3'	p425 TDH3	HindIII (N), XhoI (C)	
p426 TDH3 hRluc-CTD	425 CTD hRluc	-	p426 NTD hRluc	SmaI (N), XhoI (C)	
pUG72 hRluc-CTD	416Met25 hRluc-CYC1	fwd: 5'-GTTCCCAAGCTTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGCGGTTCaAGCCCGAGTCGTCCTCAG-3' rev: 5'-CGGAAACTGCAGAAATACGACTCACTATAGGGC-3'	pUG72	HindIII (N), PstI (C)	
426 TDH3 F1ß hRluc-NTD					
Zwischenprodukt	Ausgangsvektor	Primer	Zwischenvektor	Restriktionsenzyme	
bluescript hRluc-NTD	pGL4.70 hRluc	fwd: 5'-cga tgg a g a t c t a t g g c t t c c a a g g t g t a c -3' * rev: 5'GGG AAGCTTGGATCCGGAACCGCCACCCACAGAACTCCACCACCGCTCCCTTACGAGAGG-3' **	bluescript pBSC DAFLIII	HindIII (N), SmaI (C) (bluesc.) HindIII (PCR)	
Produktname	Ausgangsvektor	Primer	Zielvektor	Restriktionsenzyme	
p426 TDH3 F1ß hRluc-NTD	bluescript pBSC DAFLIII	-	p426 TDH3 F1ß	BamHI (N), XhoI (C) (Zielv.) BglII (N), XhoI (C) (blues.v.)	
komplementär zu Ausgangsvektor		[GGGS]-Linker	Restriktionsenzym + Überhang	Stop-Kodon	** (HindIII, BamHI)

Tabelle 2.4.1: Herstellung eines Plasmid basierten Split-Luciferase-Testsystems für *S. cerevisiae*. Gelistet sind die verwendeten Oligonukleotide mit ihren zugehörigen DNA-Sequenzen. Die Oligonukleotide wurden farblich entsprechend der Legende in unterschiedliche funktionelle Sequenzabschnitte zerlegt. Die Tabelle gibt zudem einen Überblick über die verwendeten Ausgangsvektoren, die Klonierungsstrategien und die resultierenden Zielvektoren.

Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen von Oligonukleotidpaaren aufgeführt, welche für die PCR-basierte Herstellung von DNA-Matrizen für eine genomische Integration und Fusion einer hRluc-Domäne mit einem der angezeigten Gene in *S. cerevisiae* durch somatische Rekombination genutzt wurden (Kapitel 2.3).

Primer	Oligonukleotid (5'→3')	DNA Vorlage
ATM1-CTD re.	5'- CCTTAAATCTTGAAAACTTATACATGTATAAATCAATATTTACTTACGAGCGTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
ATM1-NTD fw.	5'- GGAAGGTAAGCATCTTGAAGTGTGGAGAATGAACTAAAAGACCAGCAAGAACTAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pFA6AkanMX4
ATM1-NTD re.	5'- CCTTAAATCTTGAAAACTTATACATGTATAAATCAATATTTACTTACGAGCGTCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
BIO2 CTD re.	5'- ATAAGGGAGAAATGTACAGTTAGAATCGTAGAATTATCCACATATCCCTATCTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
BIO2 CTD fw.	5'- CAATGTTGGCTAAATGGGGATTGCAACCTATGGAGGCATTTAAGTACGACAGATCTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
BIO2 NTD re.	5'- ATAAGGGAGAAATGTACAGTTAGAATCGTAGAATTATCCACATATCCCTATCTCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
CFD1-CTD fw.	5'- CACTACAACCCCTGTTGTGATAAACACGAGCAACCCAGATAGAATCTCCAAAAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
CFD1-CTD re.	5'- ATAAACACACACACACATATATATATATACGTACATGCATAGGAGAGGATCCATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
CFD1-CTD re.	5'- ATAAACACACACACACATATATATATATATACGTACATGCATAGGAGAGGATCTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
CIA1-CTD fw.	5'- GCAACAGGCGGTGACGACGGGATCGTAAATTTCTGGTCTCTAGAAAAAGCAGCGGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
CIA1-CTD re.	5'- CAGATCGATCACTGTGTTAATATGAGTTCCTGAATTGACTCTTGCTTCTACATCATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG73 (LEU2)
CIA1-CTD re.	5'- AGATCGATCACTGTGTTAATATGAGTTCCTGAATTGACTCTTGCTTCTACATTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
CIA1-NTD re.	5'- CAGATCGATCACTGTGTTAATATGAGTTCCTGAATTGACTCTTGCTTCTACATCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
CIA2-CTD fw.	5'- GTGAGAATGAACAACTGTTGGGTGTAGTCTCTAAGATGTTAGTGACTGTGAAGGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
CIA2-CTD re.	5'- CATGTTTTTGTAGCTTCGTGAGTAAGGGAAGCAAAAAGAAGAATCCCCGTATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
CIA2-CTD re.	5'- CATGTTTTTGTAGCTTCGTGAGTAAGGGAAGCAAAAAGAAGAATCCCCGTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
GRX5-CTD fw.	5'- GCTAGAAGAGGCACAGGCATTGGTACCTGAAGAAGAAGAAGAAACCAAGATCGTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
GRX5-CTD re.	5'-CGAGTATTAAGTGTTCCGCCACCAGTTCCTATTTTGCTTCCAGTGGAACAAAATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
GRX5-NTD re.	5'- CGAGTATTAAGTGTTCCGCCACCAGTTCCTATTTGCTTCCAGTGGAACAAAACGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
IBA57-CTD re.	5'- ATATCTATTTCTATTGTCATATTCACAAGTAGTATTTACAAGGTGTTTTCGTGAAATCATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
IBA57-CTD re.	5'- ATATCTATTTCTATTGTCATATTCACAAGTAGTATTTACAAGGTGTTTTCGTGAAATTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
IBA57-NTD re.	5'-ATATCTATTTCTATTGTCATATTCACAAGTAGTATTTACAAGGTGTTTTCGTGAAATCTCGCTGTGAAGATCCCAGC -3'	pUG73 (LEU2)
IBA57-NTD fw.	5'-CACCTCAAAAACCATCTGGTTAGCGACTGGAAAAACAATAACGGGCTCATAAAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG-3'	pUG73 (LEU2)
IBA57-NTD re.	5'-ATATCTATTTCTATTGTCATATTCACAAGTAGTATTTACAAGGTGTTTTCGTGAAATCATGTCTAAGAATATCGTTG -3'	pUG73 (LEU2)
IBA57-NTD re.	5'- ATATCTATTTCTATTGTCATATTCACAAGTAGTATTTACAAGGTGTTTTCGTGAAATCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
IDH1-CTD fw.	5'-GTTCTCTTCTACTACTGACTTCACGAATGAAATCATCAACAAATTATCTACCATGGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
IDH1-CTD re.	5'- GATAAGAATTTGAACACACTTAAGTTGCAGAACAAAAAAGGGGAATTGTTTTCACATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
IDH1-CTD re.	5'- GATAAGAATTTGAACACACTTAAGTTGCAGAACAAAAAAGGGGAATTGTTTTCATTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
IDH2-NTD fw.	5'-CTTGGCTGGTACTGCTACTCTCATCTTCACTGAAGCAGTCATCAAGAGATTAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG-3'	pFA6AkanMX4
IDH2-NTD re.	5'-GATAGTCATTTGTTTTCAAGGCGTGAAAAACCTGAGAGGGAAAAAGAATAGGACTTCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
ISA1-CTD fw.	5'- CTCCAAGGGCACATGCGGTTGTGGCGAGAGTTTCATGGTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
ISA1-CTD re.	5'- GAATAGGTAGATTCCTTTTTTCTAAAAATGGTGCAGAAAGGTTTCATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
ISA1-CTD re.	5'- GAATAGGTAGATTCCTTTTTTCTAAAAATGGTGCAGAAAGGTTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
ISA1-NTD re.	5'- GAATAGGTAGATTCCTTTTTTCTAAAAATGGTGCAGAAAGGTTTCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
ISA2-CTD re.	5'- GTAAAAAATGCTTGGCAGCTGGGCATGCTATATACAGGGATGAATATAATACAGCCATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
ISA2-CTD re.	5'- GTAAAAAATGCTTGGCAGCTGGGCATGCTATATACAGGGATGAATATAATACAGCTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
ISA2-NTD fw.	5'-CATCAATGGTAGCCTAAAAAGTAGTTGTGGTGTGGGAAGTAGTTTTGATATTGAAAATGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG73 (LEU2)
ISA2-NTD re.	5'- GTAAAAAATGCTTGGCAGCTGGGCATGCTATATACAGGGATGAATATAATACAGCCATGTCTAAGAATATCGTTG -3'	pUG73 (LEU2)
ISA2-NTD re.	5'- GTAAAAAATGCTTGGCAGCTGGGCATGCTATATACAGGGATGAATATAATACAGCCTCGCTGTGAAGATCCCAGC -3'	pUG73 (LEU2)
ISA2-NTD re.	5'-GTAAAAAATGCTTGGCAGCTGGGCATGCTATATACAGGGATGAATATAATACAGCCGAGCTCGTTTTCGACACTGG-3'	pFA6AkanMX4

ISD11-CTD fw.	5'- CTCAGATGTACACATTTGACAGGCTGGTCGTAGAACCATTGCAAGGAAGAAAACACGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
ISD11-CTD re.	5'- GAAAAAATTACTGGAAGTTCTTTCTTACATGCAATGACCAGTTAGGCCAGGTTTCATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
ISD11-CTD re.	5'- GAAAAAATTACTGGAAGTTCTTTCTTACATGCAATGACCAGTTAGGCCAGGTTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
ISU1-CTD fw.	5'- GACTACAAATCTAAGAGAAACACTCCAACCATGTTATCGGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
ISU1-CTD re.	5'- GAGGGTTTGATCTTGTTCTTGCCCGGTTATCTTCTTATTCACATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
ISU2-CTD re.	5'- CCGGAAAGAGAGGACCTCTTGATTTTATCATATTATCGTATCGCCTCTCTTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
ISU2-NTD re.	5'- CCGGAAAGAGAGGACCTCTTGATTTTATCATATTATCGTATCGCCTCTCTTCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
ISU2-NTDfw.	5'- CTATCAAGGCGGCAATCAAGGACTACAAAACAAGAGGAACCCCTCCGTTTTGCATGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
JAC1-CTD re.	5'- GTTTCAGTTTTATATACCACTATTATTATTACTATTACCACTTTGGAGTACTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
JAC1-NTD re.	5'- GTTTCAGTTTTATATACCACTATTATTATTACTATTACCACTTTGGAGTACTCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
JAC1-CTD fw.	5'- CTTGGCCAAGGCATTCAAAGACTGGGCTCCAGGAAAACAATTGGAATGAATCACGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
LIP5 CTD re.	5'- CATTGCGGTCCATGCCATAATTGTTTTCTTCCAACTATTAGATTTCAAGTGTGCATTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
LIP5 CTD fw.	5'- CATATAAGGCTGGTGAAGCATTATTGAGAAGCTTTGAAGAAAAGAAACATGAAAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
LIP5 NTD re.	5'- CATTGCGGTCCATGCCATAATTGTTTTCTTCCAACTATTAGATTTCAAGTGTGCACGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
NAR1-CTD re.	5'- CACAGTTTGTTGGTGATTTACGCTTATGTACACGGGTGCAAACTACACCTTACTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
NAR1-NTD fw.	5'- CGCGCCCGTCAAGCAGGCCGTCGAAAGGATCTCGTCTCTGTTGGGAGCACCTGGGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pFA6AkanMX4
NAR1-NTD re.	5'- CACAGTTTGTTGGTGATTTACGCTTATGTACACGGGTGCAAACTACACCTTACCAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
NBP35-CTD re.	5'- ATAAACGATTGACCTCTAATGCACCTCTTTTATTCTTTTGATAAAATATATATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
NBP35-NTD fw.	5'- CTTGAGTGCTGTACTTAACGTTGTGGAGGCTCTGCGAGATGCTGTGGGGATGTAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pFA6AkanMX4
NBP35-NTD re.	5'- ATAAACGATTGACCTCTAATGCACCTCTTTTATTCTTTTGATAAAATATACGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
NFS1-NTD fw.	5'- CAAGAAGGTATTGACTTAACTCCATCAAAATGGTCAGGTATGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG73 (LEU2)
NFS1-NTD re.	5'- GAGGATTTTCTCTAAAAAATAAATAACAATAAAAAACACCATGTCTAAGAATATCGTTG -3'	pUG73 (LEU2)
Nfu1-CTD fw.	5'- GAATTTGATAAGCTTGAAAAAAGTTGGAATCGAGTAAAAATAAAGCCATGAAAGGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
Nfu1-CTD re.	5'- CACACTTCTTTTATTTTCGTCTCATCTTGATTTTCAATTTGAAGGACGGAATATTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
NFU1-NTD re.	5'- CACACTTCTTTTATTTTCGTCTCATCTTGATTTTCAATTTGAAGGACGGAATATCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
SDH2 CTD re.	5'- CAAATCATTTGAGAGGCTTCTGAGTCTTCTCGGGCTAGCTGTTTTCTGATAGTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
SDH2 CTD fw.	5'- GGGCTTGAATCCTGGTTTGGCTATTGCTGAAATTAAGAAATCTTTGGCATTGCGGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
SDH2 NTD re.	5'- CAAATCATTTGAGAGGCTTCTGAGTCTTCTCGGGCTAGCTGTTTTCTGATAGTCGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
SSQ1-CTD fw.	5'- GTAGGGCATTAAATATTTCAAAGCGCAACAAAAACCAGCAGAATCAAGGTAAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
SSQ1-CTD re.	5'- GCTTTAATGAACGATATACACGTTAATATACAAGTCTTATTGTGTTTTGTTCACTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
SSQ1-NTD re.	5'- GCTTTAATGAACGATATACACGTTAATATACAAGTCTTATTGTGTTTTGTTCACTGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
YAH1-CTD fw.	5'- GGGATTAGAGTCGCTCTGCCCCAGATGACAAGAACGTTAATAACAACGATTTTAGTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
YAH1-CTD re.	5'- GATTATTCACAGGAGAAATTGGGGGCACAAATGAGGGGTAATAATGCAGACACATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
YAH1-CTD re.	5'- GATTATTCACAGGAGAAATTGGGGGCACAAATGAGGGGTAATAATGCAGACATTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
YAH1-NTD re.	5'- GATTATTCACAGGAGAAATTGGGGGCACAAATGAGGGGTAATAATGCAGACACATGTCTAAGAATATCGTTG -3'	pUG73 (LEU2)
YAH1-NTD re.	5'- GATTATTCACAGGAGAAATTGGGGGCACAAATGAGGGGTAATAATGCAGACACGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
YAL044W-A-NTD re.	5'- CAAAGCTTATACGTACGTAAAGTAATTTATATATATATATATATAGTGGGGCAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
Yal044W-A-CTD fw.	5'- CCATGCTTTACAATTGTCACTAAAGACCCACAGGAGTATGAATCCAAAGCGAAAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
Yal044W-A-NTD re.	5'- GTAGGGGAAATAAAACAATAAACTCAACGTGTACACTTATGCTTATGCATTGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
Yal044W-A-CTD re.	5'- GTAGGGGAAATAAAACAATAAACTCAACGTGTACACTTATGCTTATGCATTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
Yal046C-CTD fw.	5'- GCATGGCCTACAATTGACCACTAAGAAGTCAACTGGGAAGGGTCCGGCATCATCAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
Yal046C-CTD-f re.	5'- GAAGCAAAAGTAACTAAAAGTGATACTTACACGAGCTTTTTGGTTCCAACTGTTTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)
YAL046C-NTD re.	5'- GAAGCAAAAGTAACTAAAAGTGATACTTACACGAGCTTTTTGGTTCCAACTGTGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
YAL046C-NTD-f re.	5'- CAATTAATAATAAATACATATATAAAGAAATATACAGAGGGAAGCAAAAGTACGAGCTCGTTTTCGACACTGG -3'	pFA6AkanMX4
YFH1-CTD fw.	5'- CTTACTGAAGAAGTTGAGAAGGCCATTTCTAAAAGCCAAGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTG -3'	pUG72 (URA3)
YFH1-CTD re.	5'- GTGTTTAAATAAATAAGAGAGTCGATGGATAAGTGCACCATGTCCACAAAATCATATAC -3'	pUG72 (URA3)
YFH1-CTD re.	5'- GATTGGATGCGTTACAAGTGTAAATAAATAAAGAGAGTCGATGGATAAGTGCACCTATTTAGGTTCTATCGAGG -3'	pUG72 (URA3)

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Manipulation von DNA und Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Manipulation von DNA und die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgten nach publizierten Methoden (Sambrook & Russel, 2001). Die spezifischen PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Luciferase-Konstrukte des in dieser Arbeit vorgestellten Split-Luciferase-Testsystems sind Tabelle 4.6.1 zu entnehmen. Da die fertigen Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation der DNA-Kassetten eine Länge von jeweils ca. 80 bp und somit Schmelztemperaturen von mitunter mehr als 90 °C aufweisen, wurde ein universelles PCR-Programm entwickelt, um schnell und reproduzierbar DNA-Matrizen für eine Hefetransformation zu generieren. Auf Grund der hohen Schmelzpunkte eignet sich die Nutzung einer Zwei-Schritt-PCR. Hierbei werden zunächst die 20 bp langen Plasmidbindestellen der Oligonukleotide in einem ersten 10 Zyklen umfassenden PCR-Programm bei niedriger Anlagerungstemperatur verlängert, und in einem zweiten 25 Zyklen umfassenden PCR-Programm wird die Amplifikation der DNA-Matrize schließlich bei höheren Temperaturen beendet. Zudem gibt man dem PCR-Ansatz 3 % (v/v) DMSO hinzu, welches eine Anlagerung der Oligonukleotide bei niedrigeren Temperaturen begünstigt (NEB). Tabelle 4.6.1 fasst das PCR-Programm zusammen und gibt ein Pipettierschema für die einzelnen Komponenten vor. GC-Puffer, DMSO (100% v/v) sowie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) wurden als fertige Lösungen von New England BioLabs (Ipswich, USA) bezogen. Gleiches galt für die verwendete Phusion-Polymerase, eine vom Hersteller modifizierte thermostabile DNA-abhängige-DNA-Polymerase.

	Temperatur [°C]	Zeit [Sek]	Komponente	Volumen [µl]
Zyklus I (10x)	98	300	GC-Puffer	10
	98	30	DMSO	1,5
	54	30	dNTPs	1
	72	100	Plasmid (1:100 vV)	5
Zyklus II (25x)	98	30	fwd. Oligonukleotid	2,5
	64	30	rev. Oligonukleotid	2,5
	72	100	ddH ₂ O	37
	72	600	Phusion Pol.	0,5
	4	-		

Tabelle 4.6.1 PCR-Programm und Pipettierschema für die Amplifikation von NTD- und CTD-hRluc Domänen aus den in Abb. 4.3.1 gezeigten Hefevektoren für die Integration der Luciferase Domänen in das Hefegenom.

4.5.2 Kolonie PCR

Als Spezialanwendung der klassischen Polymerasekettenreaktion wurde eine Kolonie-PCR für Hefezellen verwendet. Als Probenvorbereitung für eine Kolonie-PCR wurde ein Teil einer Hefezellkolonie mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 20 µl ddH₂O resuspendiert. Im Anschluss wurde die Probe mit 5 µl einer gesättigten Zymolyaselösung und 0,5 µl β-Mercapthoethanol versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Probe bei 95 °C für 5 Minuten aufgekocht, kurz abzentrifugiert und 3 µl des Überstandes für die Durchführung einer PCR genutzt.

4.5.3 Kultivierung und genetische Manipulation von *E. Coli*

Die Kultivierung von *E. Coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium, für Selektionszwecke supplementiert mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 150 rpm. Für die Herstellung von Festagarplatten wurden dem Medium zusätzlich 20 % (w/v) Agar Agar zugesetzt.

Kultivierung von *E. Coli*

LB-Medium	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	NaCl	10 g/l

E. Coli-Zellen wurden chemisch mit der Calciumchlorid-Methode kompetent gemacht (Dagert & Ehrlich, 1979) und durch „Hitzeschock“-Methode transformiert (Froger & Hall, 2007). Die Reinigung von Plasmiden aus *E. Coli* erfolgte mit dem „NucleoSpin® Plasmid“-Kit der Firma Macherey-Nagel nach Vorgabe des Herstellerprotokolls.

4.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer verwendet (Lee et al, 2012). Die nach ihrer Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des DNA-interkalierenden Fluorophors GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, USA) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

4.5.5 Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen

Die Trennung der DNA von Kontaminationen (Agarose, Enzyme, Primer, Nukleotide) erfolgte mit dem „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up“-Kit der Firma Macherey-Nagel nach Vorgabe des Herstellerprotokolls.

4.6 Zellbiologische Methoden

4.6.1 Kultivierung von Hefen

Die in dieser Dissertation verwendeten Hefestämme leiteten sich vom W303-1A-Stamm ab und wurden, sofern nicht anders annotiert, in Flüssigkulturmedium bei 30 °C und 150 rpm in einem Schüttelinkubator gemäß (Sherman, 2002) angezogen. Die Zusammensetzung von Voll- und Minimalmedium sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. Hefe-Minimalmedium wurde mit den aufgeführten Aminosäuren supplementiert. Der verwendete W303-1A-Stamm besitzt endogene Auxotrophien für Adenin, Lysin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil. Da die letzteren vier Aminosäuren als Selektionsmarker genutzt und somit lediglich nach Bedarf dem Medium zugesetzt wurden, sind sie separat aufgeführt. Agar Agar wurde beiden Medien hinzugegeben, um die Hefestämme auf Hartagarplatten anzuziehen (Sherman, 2002). Zusätzlich konnten Platten und Medien mit Antibiotika (G418 (360 mg/l) und Hygromycin B (50 mg/l)) für eine genetische Selektion supplementiert werden.

Kultivierung von *S. cerevisiae*

YP-Medium	Hefeextrakt	10 g/l
	Casein Pepton	20 g/l
	Glucose/Galactose	2% (w/v)
SC-Medium	Hefe Stickstoff Base	1,9 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
	Glucose/Galactose	2% (w/v)
	Aminosäure-Supplemente	*
Agar Agar	Agar Agar	20% (w/v)

*Aminosäure-Supplemente	(40x) Stammlösung in g/l	Finale Konzentration in mg/l
Adenin	4	100
Arginin	1	25
Asparagin	0,5	12,5
Aspartat	5	125
Glutamat	20	500
Isoleucin	1,5	37,5
Lysin	1,5	37,5
Methionin	1	25
Phenylalanin	2,5	62,5
Serin	20	500
Threonin	10	250
Tyrosin	1,5	37,5
Valin	0,6	15

Aminosäureauxotrophien des W303-1A-Stammes: Ade, Lys +

*Aminosäure-Supplemente	Stammlösung in g/l	Finale Konzentration in mg/l
Histidin	4	80
Leucin	10	60
Tryptophan	10	40
Uracil	2	20

Für eine anaerobe Kultivierung wurden Hefezellen zunächst für 16 bzw. 40 h in einer aeroben Vorkultur angezogen. Im Anschluss erfolgte die Entnahme eines Volumens an Hefekultur äquivalent der OD = 0,4. Die Zellen wurden pelletiert, anschließend in eine anaerobe Kammer unter Stickstoff/Wasserstoff-Atmosphäre eingeschleust und in 50 ml anaerobem Medium inklusive 50 µM Eisen-II-Citrat und TEM-Mix (50% (v/v) Ethanol, 50% (v/v) Tween 80, 7,5 mg/ml Ergosterol, 20 mg/l L-Methionin) aufgenommen. Das Wachstum erfolgte für weitere 24 Stunden in 50 ml-Falcons und einem Brutschrank ohne Schütteln bei 30 °C.

Als Wachstumskontrolle der Hefezellen diente die Analyse der optischen Zelldichte in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) gegen eine Referenz aus reinem Kulturmedium.

Zur Herstellung von Lagerungskulturen von Hefestämmen wurden 750 µl einer Übernachtskultur (YP-Medium) mit 150 µl 60% (w/v) Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.6.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Lithium-Acetat-Methode zur Transformation von Hefen eingesetzt (Gietz & Woods, 2002). Im Anschluss erfolgte eine zweimalige Selektion auf unterschiedlich supplementierten Minimalmedium-Agaroseplatten oder eine Selektion auf Vollmediumplatten, supplementiert mit einem Antibiotikum. Als Antibiotika kamen Geneticin G418 (360 mg/l) und Hygromycin B (50 mg/l) zum Einsatz.

4.6.3 Präparation von Mitochondrien

Als Ausgangsmaterial für Mitochondrien-Präparationen aus *S. cerevisiae* dienten zwei Liter Kulturen, angezogen in glucosehaltigem SC-Medium für 40 oder 64 h. Die Präparation der Mitochondrien erfolgte nach der bereits publizierten Methodik (Diekert et al, 2001).

4.6.4 Präparation von Hefe-Gesamtzellextrakten mit Glasperlenaufschluss

Hefezellen wurden über Nacht in 50 ml-Kulturen angezogen, im Anschluss pelletiert und einmalig mit 10 ml ddH₂O gewaschen. Die mechanische Lyse erfolgte durch dreimaliges Vortexen der Hefezellen für eine Minute in Anwesenheit von Glasperlen ($\varnothing \sim 0,5$ mm) in TNETG-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 10 % (w/v) Glycerin, 0,5 % (w/v) Triton X-100, supplementiert mit 1 mM PMSF und Roches Protease Inhibitor Mix. Zwischen den einzelnen Vortexschritten wurde das Lysat jeweils für eine Minute auf Eis gestellt. Eine niedertourige (3500 rpm, 5 Minuten, 4 °C) und eine anschließende hochtourige (12000 rpm, 5 Minuten, 4 °C) Zentrifugation entfernten größere Zelltrümmer. Der Überstand wurde für die Folgeexperimente verwendet.

4.7 Biochemische Methoden

4.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer biologischen Probe erfolgte mittels der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Für eine Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde eine Eichkurve erstellt mit definierten Mengen an BSA (NEB BSA Stock, 10 mg/ml) in ddH₂O. Das Bradford-Nachweisreagenz wurde über die Firma Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA) bezogen.

4.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse in einem Polyacrylamidgel erfolgte nach der Methode von Laemmli in einer vertikalen Gelapparatur (Laemmli, 1970).

Die genaue Menge an 1xSDS-Puffer ist im Einzelnen der Tabelle 4.7.2 zu entnehmen. Je nach benötigtem Auflösungsbereich kamen selbstgegossene SDS-Gele unterschiedlichster Acrylamid-Konzentrationen zum Einsatz. Es fanden folgende Mischungsverhältnisse und Reagenzien Verwendung:

Reagenz	Sammelgel	Trenngel			
		10%	12,50%	15%	18%
30 % (v/v) Acrylamid	1 ml	6,7 ml	8,3 ml	10 ml	12 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
0,625 M Tris-HCl pH 6,8	1 ml	-	-	-	-
10 % (w/v) SDS	50 µL	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
ddH₂O	2,8 ml	8,03 ml	6,43 ml	4,7 ml	2,7 ml
10 % (w/v) APS	50 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	5 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Tabelle 4.7.2 Übersicht über die Menge an eingesetzten Reagenzien je SDS-Gel mit entsprechenden Prozentwerten

4.7.3 „semidry“-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)

Nach der Auftrennung einer biologischen Probe in der SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und immobilisiert. Hierzu wurde ein „semidry“-Blot vorgenommen (Lauriere, 1993). Die Transferbedingungen für 10 - 12,5 % SDS - Gele waren 30 V, 250 mA, Laufzeit eine Stunde. Höher prozentige Gele wurden bei 30 V, 250 mA, für bis zu einer Stunde und 20 Minuten transferiert.

4.7.4 Färbetechniken von SDS-Gelen und von Western-Blots

Proteinbanden in SDS-Gelen wurden entweder mit einer sensitiven Silberfärbung unter Verwendung von Natriumthiosulfat (Chevallet et al, 2006) oder mit einer weniger sensitiven Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Syrový & Hodný, 1991) sichtbar gemacht. In Western-Blots wurden die Proteinbanden reversibel mit Ponceau S (Salinovich & Montelaro, 1986) angefärbt.

4.7.5 Immundetektion

Der Nachweis von Proteinen im Western-Blot erfolgte mittels Immundetektion (Harlow & Lane, 1988). Geblockt wurden die Nitrozellulosemembranen mittels eines TBS-Puffers, supplementiert mit 2% (w/v) BSA, 1 % (w/v) Tween oder alternativ mit 12,5 % (w/v) Milch, 1% (w/v) Tween. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels eines primären Antikörpers sowie der Nachweis durch einen gegen den Erstantikörper gerichteten Sekundärantikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (HRP). Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase oxidiert das im zugegebenen ECL-Reagenz (enhanced chemiluminescence system) enthaltene Luminol und generiert hierdurch ein Chemilumineszenz-Signal vor einem schwarzen Hintergrund, welches sich mittels einer CCD (charged coupled device)-Kamera detektieren und verstärken lässt.

Eine Liste aller verwendeten Antikörper mit Konzentrationsangaben sind den nachstehenden Tabellen zu entnehmen. Die direkt gegen ein Protein gerichteten Primärantikörper in Tabelle 4.7.5.1 wurden arbeitsgruppenintern hergestellt (Gelling et al, 2008; Kaut et al, 2000; Pelzer et al, 2000).

Protein	Tag	Name des Antikörpers	Organismus	Blockierung	Verdünnungsfaktor
Aco	-	α -Aco1C-3	Hase	Milch	1000
Isa1	-		Hase	Milch	1000
Isa2	-	α -Isa23-3	Hase	Milch	500
Por1	-	α -Porin 1-3	Hase	Milch	1000
Rip1	-	α -Rieske 4	Hase	Milch	1000
-	FLAG	OctA-Probe (D-8), sc-807 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)	Hase	Milch	1000
-	Myc	α -Myc tag, ab9106 (Abcam)	Hase	BSA	5000

Tabelle 4.7.5.1 Überblick über verwendete Primärantikörper

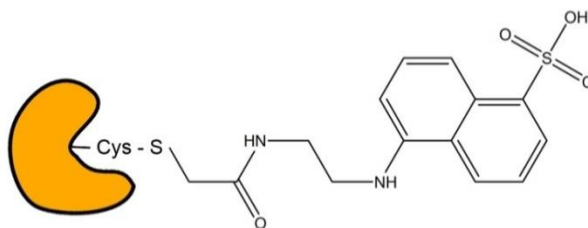
Antikörper	Verdünnungsfaktor
Streptavidin-HRP	1000
α-Hase-HRP	2500

Tabelle 4.7.5.2 Überblick über den verwendeten Sekundärantikörper und das Streptavidin-Konjugat

4.7.6 Cysteinmodifikation mit AEDANS-Reagenz

Die Cystein-SH-Sonde 1,5-I-AEDANS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) reagiert unter geeigneten Reaktionsbedingungen exklusiv mit freien Cystein-SH-Gruppen (Abb. 4.7.6, A) und lässt sich über ihre Eigenfluoreszenz unter UV-Licht (Abb. 4.7.6, B) nachweisen (Hudson & Weber, 1973). Mitochondrien wurden aus Hefezellen isoliert. Im Folgenden wurden die mitochondrialen Lysate mit AEDANS unter nichtreduzierenden Bedingungen modifiziert, TCA-präzipitiert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und das AEDANS-abhängige Fluoreszenzsignal unter UV-Licht aufgenommen (Christ, 2011).

(A) AEDANS Modifikation von Cysteinseitenketten



(B) Detektion



Abbildung 4.7.6 AEDANS-basierte Cysteinmodifikation in isolierten Mitochondrien von *S. cerevisiae*. (A) Produkt der Cystein-S-Modifikation nach Markierung mit 1,5-I-AEDANS. Die Cysteinsonde kann durch ihre Eigenfluoreszenz unter UV-Licht detektiert werden (B).

4.7.7 Cysteinmodifikation mit Maleimide-PEG₁₁-Biotin

Die hier vorgestellte Methode der Cystein-SH-Modifikation mit der Sonde Maleimid-PEG₁₁-Biotin von Thermo Fisher Scientific (MPB-11) wurde im Rahmen einer Diplomarbeit etabliert (Christ, 2011). Sie wurde in der vorliegenden Arbeit weiter verfeinert. Die Analyse der MPB-11-Modifikation erfolgte mittels SDS-PAGE und Immundetektion. Abbildung 4.7.7 zeigt den Versuchsaufbau, darunter ist ein genaues Protokoll der Modifikation zu finden.

Entsprechend den Herstellervorgaben wurde ein 250 mM Stock in Dimethylformamid (DMF) angelegt. Dieser Stock konnte unbegrenzt bei -20 °C unter Lichtabschluss gelagert werden. Für die Durchführung der Modifikation einer Probe wurde eine frische Vorverdünnung in ddH₂O vorgenommen (Konzentration: 10 mM). Die Endkonzentration für die Modifikation selbst lag bei 1 mM MPB-11, der pH der Lösung wurde konstant bei 7,4 gehalten.

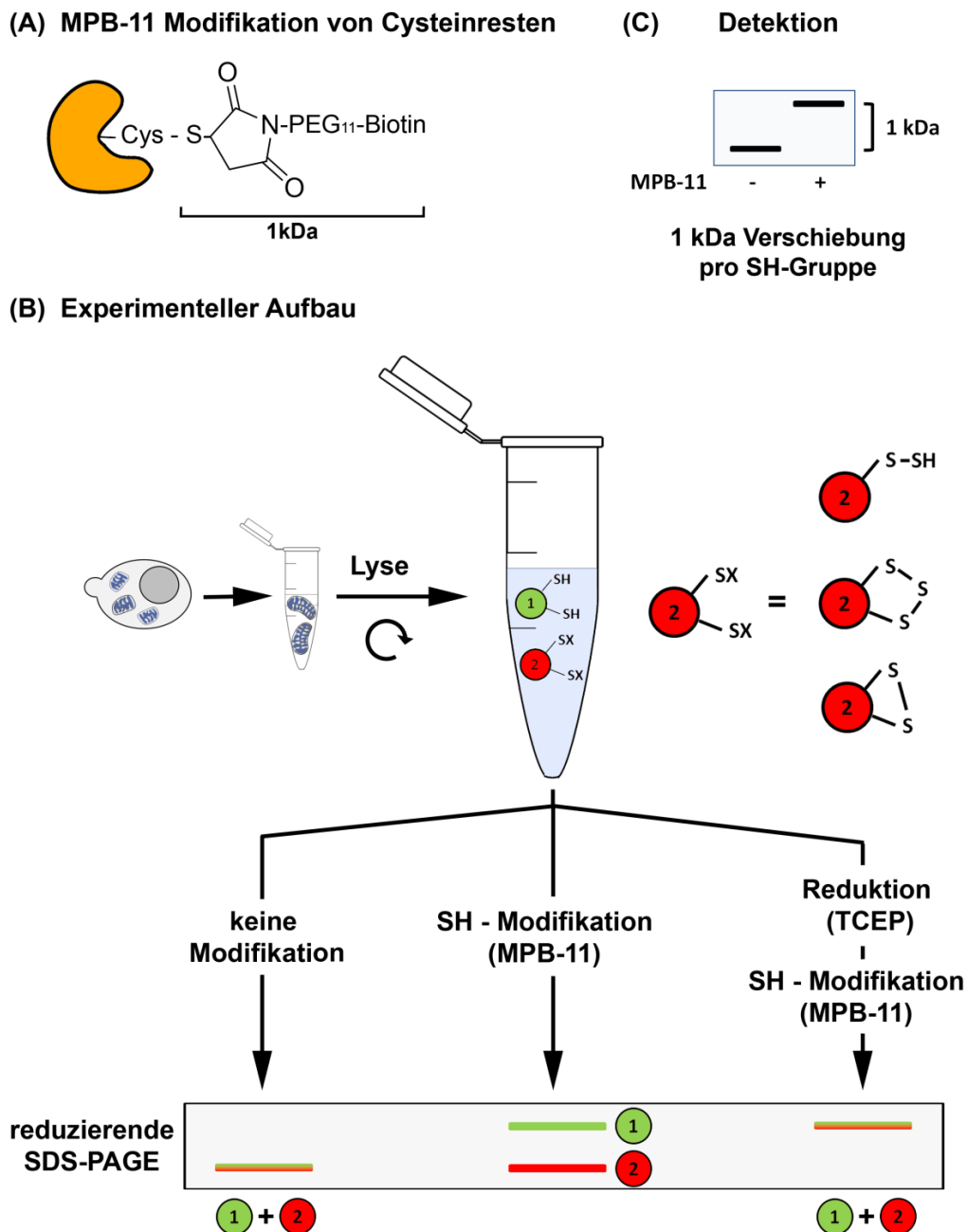


Abbildung 4.7.7 Experimenteller Aufbau für eine Modifikation von Cysteinseitenketten mit MPB-11. (A) Maleimid-PEG₁₁-Biotin (MPB-11) formt ein kovalentes Addukt an eine freie Cystein-SH-Gruppe. Die MPB-11-Modifikation wurde mit isolierten Mitochondrien gemäß dem experimentellen Aufbau in (B) ausgeführt. (C) Das mitochondriale Lysat einer Wildtypzelle wurde mit MPB-11 unter nicht reduzierenden Bedingungen (b) und nach TCEP-Reduktion (c) modifiziert. Die Zelle exprimiert eine mitochondrial lokalisierte, Myc-Tag fusionierte Version von HiPIP aus *A. vinosum*. Die modifizierten Proben wurden zusammen mit einer unmodifizierten Kontrolle (a) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Myc-Tag durch eine Immundekoration mit α -Myc Antikörpern visualisiert. Mitochondriales Porin (Por1) diente hierbei als Lade- und Modifikationskontrolle. Die mit 1-4 nummerierten Banden korrespondierten mit einer entsprechenden Anzahl an stabil MPB-11 modifizierten Cysteinseitenketten (Abbildung modifiziert nach (Christ, 2011)).

MBP-11 Modifikationen in isolierten Mitochondrien

- 200 µg Protein/Ansatz
- auf 200 µl mit Puffer A* auffüllen, supplementiert mit 3% (w/v) Dodecylmaltosid (DM), 1 mM PMSF, Roches Inhibitor Mix
- 5 Minuten auf Eis stehen lassen
- Zentrifugation bei 18800 g für 5 min
- Aufteilen der Proben nach dem in Abb. 4.7.7, C gezeigten Schema

* Puffer A: Herstellung von „Puffer A“: 20 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA

Keine Modifikation

- 50 µl Überstand aus der Zentrifugation
- + 50 µl 25% (w/v) TCA, vortexen
- 10 min auf Eis stehen lassen
- Zentrifugation bei 18800g für 10 Minuten
- Überstand verwerfen
- 2x waschen in 1 ml 90 % (v/v) Aceton (-20°C)
- Pellet an der Luft trocknen lassen bei Raumtemperatur
- + 25 µl 1 x SDS Probenpuffer + ME (5 % (v/v) finale Konzentration)
- 30 Minuten schütteln bei 1000 rpm bei Raumtemperatur
- Aufkochen der Probe bei 95 °C für 3 Minuten

SH-Modifikation (MPB-11)

- 50 µl Überstand aus der Zentrifugation
- + 5 µl MPB-11 (10 mM Vorverdünnung in Wasser)
- 30 Minuten auf Eis stehen lassen (pH ~7,4)
- Zugabe von 5 µl 0,1 M Cystein
- 10 Minuten auf Eis stehen lassen
- + 60 µl 25 % (w/v) TCA, vortexen
- 10 Minuten auf Eis stehen lassen
- Zentrifugation bei 18800 g für 10 Minuten
- Überstand verwerfen
- 2x waschen in 1 ml 90 % (v/v) Aceton
- Pellet an der Luft trocknen lassen bei Raumtemperatur
- + 25 µl 1 x SDS Probenpuffer + ME (5% (v/v) finale Konzentration)

- 30 Minuten schütteln bei 1000 rpm bei Raumtemperatur
- Aufkochen der Probe bei 95 °C für 3 Minuten

Reduktion (TCEP) und SH-Modifikation (MPB-11)

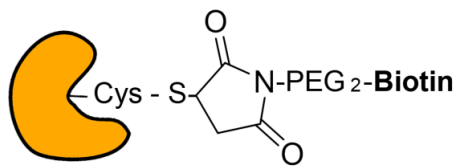
- 100 µl Überstand aus der Zentrifugation
- + 10 µl 0.1 M TCEP
- 30 Minuten auf Eis stehen lassen (pH ~3,6)
- + 120 µl 25% (w/v) TCA, vortexen
- 10 Minuten auf Eis stehen lassen (pH ~0,1)
- Zentrifugation bei 18800 g für 10 Minuten
- Überstand verwerfen
- 2x waschen in 1 ml 90% (v/v) Aceton
- Pellet an der Luft kurz antrocknen lassen bei Raumtemperatur
- Zugabe 25 µl 25 mM TRIS pH7,4 + 0,1 % (w/v) SDS
- 10 Minuten schütteln bei 1000 rpm bei Raumtemperatur
- + 10 µl MPB-11 (10 mM Vorverdünnung in ddH₂O)
- Probe 2 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt stehen lassen (unvollständige Modifikation) oder 2 h bei 37 °C und 1000 rpm schütteln (vollständige Modifikation)
- Zugabe von 2 µl Bromphenolblau (Konzentration: 0,006 % (m/v) in ddH₂O) zur groben Kontrolle des pHs; bei gelber Verfärbung neutralisieren mittels Zugabe von NaOH)
- Zugabe von 30 µl 2 x SDS Probenpuffer + ME (5% (v/v) finale Konzentration)
- 30 Minuten schütteln bei 1000 rpm bei Raumtemperatur
- Aufkochen der Probe bei 95 °C für 3 Minuten

4.7.8 Cysteinmodifikation mit Maleimide-PEG₂-Biotin

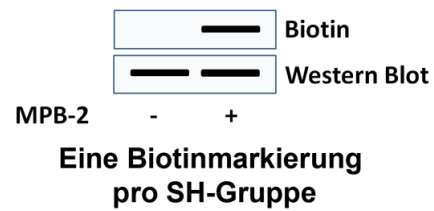
Die hier vorgestellte Methode der Cystein-SH-Modifikation mit der Sonde Maleimid-PEG₂-Biotin von Thermo Scientific (MPB-2) wurde in einer Diplomarbeit etabliert (Christ, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde sie weiter verfeinert. Abbildung 4.7.8 gibt einen Überblick über den experimentellen Aufbau, darunter ist ein ausführliches Versuchsprotokoll zu finden.

Das verwendete Maleimid-PEG₂-Biotin wurde nach Herstellervorgabe als Stock-Lösung in DMF mit einer Konzentration von 250 mM angesetzt und unbegrenzt bei -20 °C gelagert. Für jede durchgeführte MPB-2-Modifikation wurde eine frische Vorverdünnung in ddH₂O mit einer Konzentration von 20 mM angefertigt. Die MPB-2-Konzentration für die Modifikation selbst lag bei 1 mM. Die Reaktionsbedingungen wurden zwischen pH 6,5 - 7,5 gewählt.

(A) MPB-2 Modifikation von Cysteinresten



(C) Detektion



(B) Experimenteller Aufbau

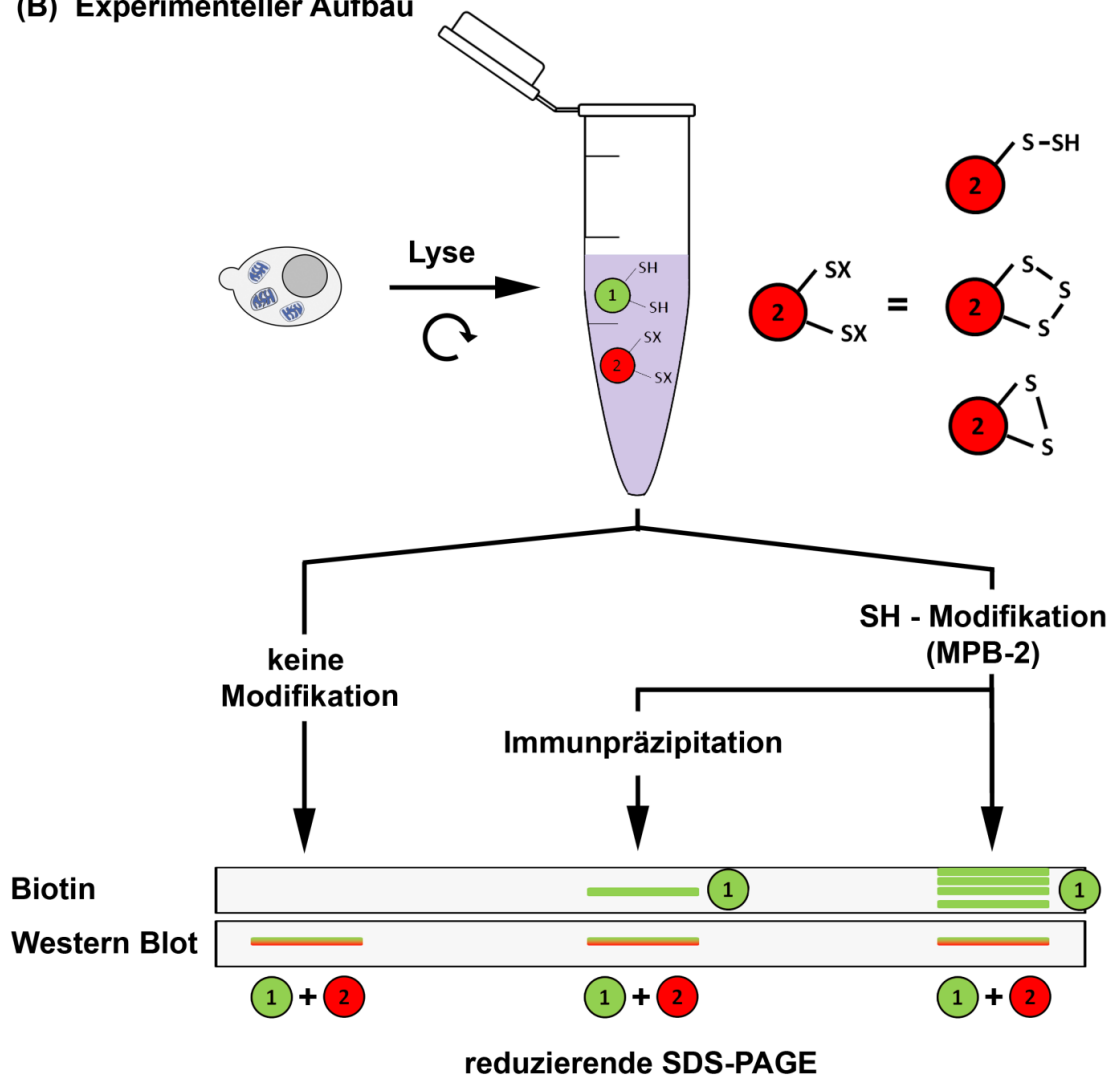


Abbildung 4.7.8 Experimenteller Aufbau der MPB-2-Modifikation. Maleimid-PEG₂-Biotin (MPB-2) formt ein kovalentes Addukt an eine freie Cystein-SH-Gruppe (A). Die MPB-2-Modifikation wurde mit Zellextrakten gemäß der gezeigten Schemazeichnung (B) und dem unten angefügten detaillierten Versuchsprotokoll ausgeführt. (C) Im SDS-Gel wurde die Biotinylierung des modifizierten Proteins durch das MPB-2-Addukt nachgewiesen.

MPB-2-Markierung von cytosolischen Proteinen

Kultivierung von Hefekulturen in glucosehaltigem Minimalmedium für 40 bis 64 Stunden (siehe zellbiologische Methoden).

- Pelletieren der Zellkulturen bei 1800 g für 5 Minuten
- Hefezellen in 10 ml ddH₂O waschen und erneut pelletieren
- Überstand vollständig abnehmen
- Bestimmung des Nassgewichts des Pellets
- Hefezellaufschluss nach Glasperlenmethode (siehe Kapitel 4.6.4)

Probe nach dem experimentellen Ablaufschema aus Abbildung 4.7.8 aufteilen.

Keine Modifikation

- 20 µl Gesamtzellextrakt + 30 µl ddH₂O + 50 µl 25% (w/v) TCA
- vortexen
- 10 Minuten auf Eis stehen lassen
- Zentrifugation bei 18800 g für 10 Minuten
- Überstand verwerfen
- 2x waschen in 1 ml 90 % (v/v) Aceton
- Pellet trocknen bei Raumtemperatur
- Zugabe von 25 µl 1 x SDS Probenpuffer + ME (5% (v/v) finale Konzentration)
- 30 Minuten schütteln bei 1000 rpm bei Raumtemperatur
- Aufkochen der Probe bei 95 °C für 3 Minuten

SH-Modifikation (MPB-2) und Immunpräzipitation

- 350 µl Lysat + 17,5 µl MPB-2 (20 mM Vorverdünnung in ddH₂O) + 7 µl Tris-Puffer, pH 7,4 (pH_{Modifikation} ~7)
- Probe für zwei Stunden auf Eis modifizieren
- Inaktivierung überschüssiger MPB-2-Sonde mittels Zugabe von 7 µl 0,1 M Cystein
- 10 Minuten auf Eis stehen lassen

SH-Modifikation (MPB-2)

- 20 µl der Probe aus der MPB-2-Modifikation werden wie oben beschrieben TCA-gefällt
-

- restliche Probe + 10 µl α-Myc-beads
- Proben für Immunpräzipitation für eine Stunde bei 4 °C sanft kontinuierlich durchmischen

- Zentrifugation bei 900 g für 5 Minuten bei 4 °C
- 2 x waschen in 500 µl TNETG-Puffer
- Zugabe von 40 µl 1 x SDS-Ladepuffer + ME (5% (v/v) finale Konzentration)
- Proben bei 95 °C für 3 Minuten aufkochen
- Zentrifugation bei 13.800 g für 5 Minuten
- Überstand in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen

4.7.9 Proteinreinigung von HiPIP aus Mitochondrien von *S. cerevisiae*

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei Protokolle für die Reinigung des in *S. cerevisiae* mitochondrial überexprimierten Proteins HiPIP aus *Allochromatium vinosum* etabliert. HiPIP sollte hierbei zum einen in seiner Holo-Form aus den Mitochondrien von Wildtypzellen (W303-1A) und zum anderen in seiner Apo-Form aus den Mitochondrien von Gal-*ARH1*-Zellen isoliert werden (siehe Kapitel 1.2). Um eine endogene chemische Cysteinmodifikation auf Apo-HiPIP zu untersuchen, wurde eine native Reinigungsmethode angestrebt.

Stammhintergrund: W303-1A

Expressionsplasmid: 426 F1β HiPIP-Myc

Kulturbedingungen: Minimalmedium, 2 % (w/v) Glucose, alle proteinogenen Aminosäuren (-Ura), 50 µM Fe-Ammoniumcitrat

① Präparation von Mitochondrien

② Anionenaustauschchromatographie

Anionenaustauschmaterial: Q-Sepharose, fast flow

Elutionspuffer: 40 mM Tris-HCl pH8,0, 100-210 mM NaCl

③ HPLC Gelfiltration

Gelfiltrationssäule: Shodex KW-802.5

HPLC-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 8,0

Flussrate: 0,5 ml/min, 4 °C

Abbildung 2.7.9.1 Reinigung von HiPIP-Myc aus den Mitochondrien von *S. cerevisiae*. Eine an ein Myc-Tag fusionierte Version von HiPIP aus *A. vinosum* wurde in den Mitochondrien des Wildtyps und verschiedener ISC-Mutanten von *S. cerevisiae* überexprimiert und in einem Drei-Schritt-Verfahren gereinigt. Im ersten Reinigungsschritt wurden die Mitochondrien isoliert, es folgte eine Ionenaustauschchromatographie. Das Eluat des Anionenaustauschers wurde ankonzentriert und durch eine HPLC-Gelfiltrationschromatographie gereinigt.

Das erste hier etablierte Reinigungsprotokoll beschreibt eine Drei-Schritt-Reinigung von HiPIP-Myc aus den Mitochondrien von *S. cerevisiae* (Abb. 4.7.9.1). Im ersten Reinigungsschritt wurden Mitochondrien aus Hefezellen isoliert. Hierzu wurde ein HiPIP-Myc-Konstrukt mit einer mitochondrialen F1 β -Zielsequenz in einem 426 2 μ -Plasmid in Hefezellen transformiert. Für die Isolation von Mitochondrien wurden Hefezellen gemäß Kapitel 4.6.3 in einem 2 Liter Maßstab mit Hilfe von Schüttelinkubatoren in supplementiertem Minimalmedium (- Uracil) angezogen. Isolierte Mitochondrien wurden gepoolt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. HiPIP aus *A. vinosum* konnte bereits mit dieser Methode in anderen Arbeiten in großen Mengen aus *E. coli* gereinigt werden (Agarwal et al, 1993; Nogi et al, 2000). Der isoelektrische Punkt HiPIPs (Aminosäuresequenz, siehe Abb. 1.2.1, A) wurde mit Hilfe des ExPASy ProtParam-Web-Tools (Wilkins et al, 1999) bestimmt und ergab einen theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins ohne mitochondriale Zielsequenz von $pI=4,58$ und ein Molekulargewicht von 10420,4 Da. Als Anionenaustauschmaterial wurde hier daher Q-Sepharose in einem Tris-HCl-Puffer $pH=8,0$ verwendet. Der physiologische pH von Mitochondrien liegt bei ca. 8,0 (Abad et al, 2004; Llopis et al, 1998). 2 mg mitochondriales Protein wurden pro Ansatz in 500 μ l Puffer A (2 mM Tris-HCL, pH 8,0) in Anwesenheit von 1 mM PMSF, Roches Protease Inhibitor-Mix und 1 % (v/v) Tween-20 lysiert. Das Lysat wurde kurz bei 16400 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit 5 ml Puffer A voräquilibrierten Q Sepharose Fast Flow Säule geladen (100 μ l Q Sepharose/Ansatz). Nach Zugabe von weiteren 200 μ l Puffer A wurde die beladene Säule verschlossen und für 15 min bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Säule dreimal mit jeweils 250 μ l Puffer A_E (40 mM Tris-HCl, pH 8,0) mit aufsteigender NaCl-Konzentration gewaschen: 30, 50 und 70 mM NaCl. Die Elution erfolgte mit viermal 250 μ l Puffer A_E mit aufsteigender NaCl-Konzentration: 100, 130, 170, 210 mM NaCl. Die Eluate wurden gepoolt und mit Hilfe von Filtersäulchen auf ca. 200 μ l ankonzentriert (Vivaspin 500, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen).

Im dritten Reinigungsschritt wurde das Konzentrat des Ionenaustauschers mit Hilfe einer HPLC-Gelfiltration aufgetrennt. Die HPLC-Gelfiltration wurde im Elutionspuffer (Puffer A_E) bei 4 °C auf einer Shodex KW-802.5-Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min ausgeführt. Die HiPIP-enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und mit Hilfe der bereits beschriebenen Filtersäulchen auf ein Endvolumen von ca. 100 μ l ankonzentriert. Die ankonzentrierten Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Stammhintergrund: W303-1A

Expressionsplasmid: 426 F1 β HiPIP-FLAG

Kulturbedingungen: Minimalmedium, 2 % (w/v) Glucose, alle proteinogenen Aminosäuren (-Ura), 50 μ M Fe-Ammoniumcitrat

① Präparation von Mitochondrien

② Immunaффinitätsreinigung und native Elution

Gel-gekoppelte Antikörper: anti-Flag-M2-Aффinitätsgel, Sigma Aldrich

Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA,

250 μ g/ml FLAG-Peptid

③ HPLC Gelfiltration

Gelfiltrationssäule: Shodex KW-802.5

HPLC-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 7,4

Flussrate: 0,5 ml/min, 4 °C

Abbildung 2.7.9.2 Reinigung von HiPIP-FLAG aus Mitochondrien von *S. cerevisiae*. Eine FLAG-getaggte Version HiPIPs aus *A. vinosum* wurde in drei Schritten gereinigt. Reinigungsprotokoll: Im ersten Schritt wurden Mitochondrien isoliert, aus denen wiederum HiPIP-FLAG durch eine Affinitäts-Reinigung mit Anti-FLAG-M2 Affinitäts-Gel gereinigt wurde. Die Elution des immunpräzipitierten Proteins erfolgte nativ mit FLAG-Peptid. Der dritte Reinigungsschritt erfolgte durch eine Gelfiltrationschromatographie.

Um größere Ausbeuten der Proteinreinigung HiPIPs aus den Mitochondrien von *S. cerevisiae* zu gewinnen, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein zweites Drei-Schritt-Reinigungsverfahren entwickelt (Abb. 2.7.9.2). Das Myc-Tag am C-Terminus von HiPIP wurde hierzu durch ein FLAG-tag mittels PCR basierter Klonierungsstrategie ausgetauscht. Die Menge an Ausgangsmaterial für eine Reinigung HiPIPs wurde ebenfalls erhöht auf nun 5 x 2 Liter Wildtyphefen und 9 x 2 Liter Gal-*ARH1*-Zellen. Die Mitochondrien wurden wie beschrieben isoliert (Kapitel 4.6.3). Die Menge an Zellen aus diesen Ansätzen lieferte 16 bis 20 mg mitochondriales Protein. Die Mitochondrien wurden im Anschluss in insgesamt 8 ml Puffer F (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,3% (w/v) Dodecylmaltosid), supplementiert mit 1 mM PMSF und Roches Protease Inhibitor-Mix für 10 Minuten auf Eis lysiert. Es folgte eine niedertourige Zentrifugation und eine Immunpräzipitation von HiPIP-FLAG aus dem Lysat mit Hilfe von 800 μ l anti-FLAG-M2-Aффinitätsgel (Sigma Aldrich) für eine Stunde bei 4 °C. Das Präzipitat wurde dreimal mit 6 ml Puffer F gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 x 200 μ l Puffer F, supplementiert mit 250 μ g/ml FLAG-Peptid (Sigma Aldrich), für jeweils 30 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler. Das Eluat wurde gepoolt und wie oben beschrieben mit Hilfe eines Filtersäulchens auf ca. 100 μ l ankonzentriert. Der dritte Reinigungsschritt erfolgte analog der HPLC-Gelfiltrationschromatographie aus dem ersten Reinigungsprotokoll für HiPIP-Myc.

Die Verwendung der FLAG-Immunpräzipitation anstelle des Ionenaustauschers hatte den entscheidenden Vorteil, dass die zweite Reinigungsstufe bereits eine deutlich reinere Fraktion lieferte und somit verhältnismäßig größere Proteinmengen von HiPIP-FLAG auf die Shodex KW-802.5-Säule geladen und somit gereinigt werden konnten.

4.7.10 Massenspektrometrische Analyse von gereinigten Fe/S-Proteinen

Gereinigtes HiPIP-FLAG-Protein (Kapitel 4.7.9) wurde vor der Injektion in ein LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific Waltham, USA) mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) vermischt und entsprechend der Herstellervorgabe mit ZipTips C18 (Merk Millipore Ltd., Tullagreen, IRL) entsalzt. Die Elution von der C18-Matrix der ZipTips erfolgte in zwei Schritten: zunächst 5 µl Lösung 1 (50 % (v/v) Acetonitril (ACN), 0,1 % (v/v) TFA) und im Anschluss 5 µl Lösung 2 (75 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA). Das Eluat wurde in einer Schnellgefriertrocknungsanlage (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) eingedampft und das Pellet in 4 µl Lösung 3 gelöst (50 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Essigsäure). Um reduziertes HiPIP-FLAG im Massenspektrometer zu analysieren, wurden die Proben unmittelbar vor der ZipTip Behandlung für 30 min bei 4 °C mit 100-fach molarem Überschuss an TCEP inkubiert. Die massenspektrometrische Messung wurde durch manuelle Injektion in ein LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Waltham, USA) Massenspektrometer vorgenommen. An die hierbei verwendeten metallbedampften Glaskapillaren PicoTip EMITTER, EconoTip (New Objective, Woburn, USA), wurde eine Ausgangsspannung von 1,4 - 1,5 V bei einer Temperatur von 275 °C angelegt. Fourier-Transformations-Massenspektrometrie wurde in einem Masse-zu-Ladungs-Bereich von 560 bis 2000 ausgeführt, die Auflösung betrug 24000.

4.7.11 oxICAT

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die oxICAT-Methode mit isolierten Mitochondrien gemäß dem Protokoll der denaturierenden ICAT-Modifikation in DAB-Puffer des Herstellers und der publizierten Arbeiten von Leichert et al. ausgeführt (Leichert; Lindemann & Leichert, 2012).

4.7.12 *De novo* Insertion von Fe⁵⁵ in Fe/S-Proteine *in vivo*

Die *de novo* Insertion von Fe⁵⁵ in Fe/S-Proteine *in vivo* wurde gemäß der publizierten Vorgaben ausgeführt (Molik et al, 2007).

4.7.13 Split-Luciferase-Messungen

Im Rahmen des zweiten Teilprojektes dieser Dissertation wurde ein *Renilla* Split-Luciferase-Testsystem für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* entwickelt. Gemäß Kapitel 2.2 wurde die Luciferase aus *Renilla Reniformis* in zwei Domänen geteilt: eine N-terminale Domäne von ca. 25 kDa und eine kleinere C-terminale Domäne von ca. 9 kDa und genomisch an verschiedene Gene der Bäckerhefe fusioniert (Paulmurugan & Gambhir, 2003). Details zu den molekularen Werkzeugen des hier etablierten *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems sowie Vorgaben zur Herstellung von hRluc-Fusionsproteinen in *S. cerevisiae* sind den Kapiteln 2.2 und 2.3 zu entnehmen.

Hefezellen, in denen zwei unterschiedliche Gene jeweils mit einer der beiden hRluc-Domänen fusioniert worden waren, wurden in 5 ml supplementiertem Minimalmedium über Nacht (16 h) angezogen, am Morgen auf eine OD = 0,2 verdünnt und im Anschluss für weitere ca. 5 h bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wachengelassen. Im Anschluss wurden die Zellen pelletiert (50 ~ 100 mg Zellen aus einer 5 ml Zellkultur), einmalig mit 1 ml ddH₂O gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Luciferasemessung bei -20 °C gelagert.

Für die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden die Zellpellets frisch auf Eis aufgetaut und in 200 µl Lysepuffer aufgenommen: 50 % (v/v) „2x Lysis Juice“ (Renilla Assay-kit, PJK GmbH), supplementiert mit 7 % (w/v) Glycerin, 1 mM PMSF, Roches Protease-Inhibitor Mix. Nach Zugabe von drei Spatelspitzen Glaskügelchen (Ø ~ 0,5 mm) wurden die Zellen für 15 Minuten auf einem Vortexer bei 4 °C lysiert, anschließend bei 4700 g für 3 Minuten und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 13800 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte mit 20 µl des Überstandes in einem Einzel-Röhren-Chemiluminometer SiriusL der Firma Titertek, Berthold. Dieses Chemiluminometer verfügt über ein Autoinjektionssystem, mit dessen Hilfe 100 µl „Renilla-Juice“ (PJK GmbH) pro Probe injiziert wurden. Nach 0,4 ms wurde die maximale Luciferaseaktivität der Probe im Flash-Experiment gemessen. Im Anschluss an die Luciferase-Messung erfolgte eine Bradford-Proteinbestimmung gemäß Kapitel 4.7.1. Das gemessene Chemilumineszenz-Signal wurde auf die Proteinmenge der jeweiligen Probe normiert.

4.7.14 Enzymatische Messungen

Zur Kontrolle der Depletionseffizienz der in Kapitel 4.2 gelisteten galactoseregulierbaren ISC- und CIA-Mutanten wurden unter anderem Aktivitätsmessungen verschiedener endogener Enzyme durchgeführt. Tabelle 4.7.14 gibt einen Überblick über die untersuchten Enzyme. Der Nachweis der

Aktivität erfolgte mittels fluoreszenzspektrometrischer Analyse des Auf- oder Abbaus eines detektierbaren Substrats oder Produkts. Aus der Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion und des bekannten Absorptionskoeffizienten wurde die spezifische enzymatische Aktivität der Enzyme bestimmt. Eine Abnahme der Katalyseeffizienz der Fe/S-Enzyme lässt auf Defekte in der Fe/S-Cluster-Assemblierung schließen. Zur Kontrolle der Spezifität des beobachteten Aktivitätsverlusts wurde zudem die enzymatische Aktivität der nicht-Fe/S-Proteine Malatdehydrogenase (Mdh) und Alkoholdehydrogenase (Adh) gemessen.

Eisen-Schwefel-Marker-Enzym	Kompartiment	Quelle
Succinat-Dehydrogenase	Mitochondrien	(Robinson & Lemire, 1995)
Aconitase	Cytosol, Mitochondrien	(Drapier & Hibbs, 1996)
Cytochrom-C Oxidase	Mitochondrien	(Kispal et al, 1999)
Kontrollenzym	Kompartiment	Quelle
Malat-Dehydrogenase	Mitochondrien	(Bergmeyer, 1974)
Alkoholdehydrogenase	Cytosol	(Kispal et al, 1999)

Tabelle 4.7.14 Übersicht über durchgeführte enzymatische Messungen

Literaturverzeichnis

Abad MF, Di Benedetto G, Magalhaes PJ, Filippin L, Pozzan T (2004) Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant. *The Journal of biological chemistry* **279**: 11521-11529

Adam AC, Bornhovd C, Prokisch H, Neupert W, Hell K (2006) The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *The EMBO journal* **25**: 174-183

Agarwal A, Tan J, Eren M, Tevelev A, Lui SM, Cowan JA (1993) Synthesis, cloning and expression of a synthetic gene for high potential iron protein from *Chromatium vinosum*. *Biochemical and biophysical research communications* **197**: 1357-1362

Alves R, Herrero E, Sorribas A (2004) Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism: I. The role of the protein pair ferredoxin-ferredoxin reductase (Yah1-Arh1). *Proteins* **56**: 354-366

Angelini S, Gerez C, Ollagnier-de Choudens S, Sanakis Y, Fontecave M, Barras F, Py B (2008) NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress and iron starvation conditions. *The Journal of biological chemistry* **283**: 14084-14091

Averill BA, Eldredge P. (2012) Principles of General Chemistry, v. 1.0.

Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW (2008) Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **72**: 110-125, table of contents

Balk J, Aguilar Netz DJ, Tepper K, Pierik AJ, Lill R (2005) The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. *Molecular and cellular biology* **25**: 10833-10841

Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Muhlenhoff U, Lill R (2004) The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *The EMBO journal* **23**: 2105-2115

Banci L, Brancaccio D, Ciofi-Baffoni S, Del Conte R, Gadepalli R, Mikolajczyk M, Neri S, Piccioli M, Winkelmann J (2014) [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 6203-6208

Bandyopadhyay S, Naik SG, O'Carroll IP, Huynh BH, Dean DR, Johnson MK, Dos Santos PC (2008) A proposed role for the *Azotobacter vinelandii* NfuA protein as an intermediate iron-sulfur cluster carrier. *The Journal of biological chemistry* **283**: 14092-14099

Barros MH, Nobrega FG, Tzagoloff A (2002) Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **277**: 9997-10002

Bartsch RG (1978) Purification of (4Fe-4S)₁₋₂-ferredoxins (high-potential iron-sulfur proteins) from bacteria. *Methods in enzymology* **53**: 329-340

Beckmann JD, Ljungdahl PO, Lopez JL, Trumpower BL (1987) Isolation and characterization of the nuclear gene encoding the Rieske iron-sulfur protein (RIP1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **262**: 8901-8909

Beinert H, Holm RH, Munck E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**: 653-659

Belli G, Molina MM, Garcia-Martinez J, Perez-Ortin JE, Herrero E (2004) *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *The Journal of biological chemistry* **279**: 12386-12395

Bergmeyer HU (1974), Vol. I, 2nd edn. Methods of Enzymatic Analysis.

- Berndt C, Lillig CH, Holmgren A (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et biophysica acta* **1783**: 641-650
- Boyd ES, Thomas KM, Dai Y, Boyd JM, Outten FW (2014) Interplay between oxygen and Fe-S cluster biogenesis: insights from the Suf pathway. *Biochemistry* **53**: 5834-5847
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254
- Braun KP, Cody RB, Jr., Jones DR, Peterson CM (1995) A structural assignment for a stable acetaldehyde-lysine adduct. *The Journal of biological chemistry* **270**: 11263-11266
- Bruckner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U (2009) Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences* **10**: 2763-2788
- Cameron JM, Janer A, Levandovskiy V, Mackay N, Rouault TA, Tong WH, Ogilvie I, Shoubridge EA, Robinson BH (2011) Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *American journal of human genetics* **89**: 486-495
- Cammack R, Balk J (2014) *Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells, Chapter 12 Iron-Sulfur Clusters*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Carter CW, Jr., Kraut J, Freer ST, Nguyen Huu X, Alden RA, Bartsch RG (1974) Two-Angstrom crystal structure of oxidized Chromatium high potential iron protein. *The Journal of biological chemistry* **249**: 4212-4225
- Chalkley RJ, Baker PR, Medzihradszky KF, Lynn AJ, Burlingame AL (2008) In-depth analysis of tandem mass spectrometry data from disparate instrument types. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**: 2386-2398
- Chan MK, Kim JS, Rees DC (1993) The Nitrogenase Femo-Cofactor and P-Cluster Pair - 2.2-Angstrom Resolution Structures. *Science* **260**: 792-794
- Chen KY, Morris JC (1972) Kinetics of Oxidation of Aqueous Sulfide by O₂. *Environmental science & technology* **6**: 529-&
- Chen XJ, Wang X, Butow RA (2007) Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 13738-13743
- Chevallet M, Luche S, Rabilloud T (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols* **1**: 1852-1858
- Christ S (2011) Analyse der chemischen Modifizierbarkeit der Cysteinliganden von Apo-Fe/S-Proteinen während der Fe/S-Kofaktor-Assemblierung. Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg, Marburg
- Cicchillo RM, Booker SJ (2005) Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in Escherichia coli: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *Journal of the American Chemical Society* **127**: 2860-2861
- Cipollone R, Ascenzi P, Visca P (2007) Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life* **59**: 51-59
- Conti E, Franks NP, Brick P (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287-298
- Craig EA, Marszalek J (2002) A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **59**: 1658-1665

Cupp JR, McAlister-Henn L (1992) Cloning and characterization of the gene encoding the IDH1 subunit of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **267**: 16417-16423

Cupp JR, McAlister-Henn L (1993) Kinetic analysis of NAD(+)-isocitrate dehydrogenase with altered isocitrate binding sites: contribution of IDH1 and IDH2 subunits to regulation and catalysis. *Biochemistry* **32**: 9323-9328

Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28

de Beus MD, Chung J, Colon W (2004) Modification of cysteine 111 in Cu/Zn superoxide dismutase results in altered spectroscopic and biophysical properties. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**: 1347-1355

Dean DR, Bolin JT, Zheng L (1993) Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *Journal of bacteriology* **175**: 6737-6744

DeLuca M, McElroy WD (1974) Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry* **13**: 921-925

Diekert K, de Kroon AI, Kispal G, Lill R (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in cell biology* **65**: 37-51

Drapier JC, Hibbs JB, Jr. (1996) Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods in enzymology* **269**: 26-36.

Duby G, Foury F, Ramazzotti A, Herrmann J, Lutz T (2002) A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Human molecular genetics* **11**: 2635-2643

Emptage MH, Kent TA, Kennedy MC, Beinert H, Munck E (1983) Mossbauer and EPR studies of activated aconitase: development of a localized valence state at a subsite of the [4Fe-4S] cluster on binding of citrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 4674-4678

Ferrer-Sueta G, Manta B, Botti H, Radi R, Trujillo M, Denicola A (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chemical research in toxicology* **24**: 434-450

Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246

Fox NG, Das D, Chakrabarti M, Lindahl PA, Barondeau DP (2015) Frataxin Accelerates [2Fe-2S] Cluster Formation on the Human Fe-S Assembly Complex. *Biochemistry*

Froger A, Hall JE (2007) Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE*: 253

Froschauer EM, Schweyen RJ, Wiesenberger G (2009) The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et biophysica acta* **1788**: 1044-1050

Fujikawa Y, Kato N (2007) Split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in *Arabidopsis* protoplasts. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **52**: 185-195

Funk M, Niedenthal R, Mumberg D, Brinkmann K, Ronicke V, Henkel T (2002) Vector systems for heterologous expression of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology* **350**: 248-257

Garland SA, Hoff K, Vickery LE, Culotta VC (1999) *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *Journal of molecular biology* **294**: 897-907

Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau

- V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147
- Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, Lill R, Muhlenhoff U (2008) Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Molecular and cellular biology* **28**: 1851-1861
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737-741
- Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* **350**: 87-96
- Greiner R, Palinkas Z, Basell K, Becher D, Antelmann H, Nagy P, Dick TP (2013) Polysulfides link H2S to protein thiol oxidation. *Antioxidants & redox signaling* **19**: 1749-1765
- Haack TB, Rolinski B, Haberberger B, Zimmermann F, Schum J, Strecker V, Graf E, Athing U, Hoppen T, Wittig I, Sperl W, Freisinger P, Mayr JA, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H (2013) Homozygous missense mutation in BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings. *Journal of inherited metabolic disease* **36**: 55-62
- Harlow E, Lane D (1988), Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Haunhorst P, Hanschmann EM, Brautigam L, Stehling O, Hoffmann B, Muhlenhoff U, Lill R, Berndt C, Lillig CH (2013) Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. *Molecular biology of the cell* **24**: 1895-1903
- Hausmann A, Aguilar Netz DJ, Balk J, Pierik AJ, Muhlenhoff U, Lill R (2005) The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3266-3271
- Hausmann A, Samans B, Lill R, Muhlenhoff U (2008) Cellular and Mitochondrial Remodeling upon Defects in Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *The Journal of biological chemistry* **283**: 8318-8330
- Hebert A, Forquin-Gomez MP, Roux A, Aubert J, Junot C, Heilier JF, Landaud S, Bonnarme P, Beckerich JM (2013) New insights into sulfur metabolism in yeasts as revealed by studies of *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology* **79**: 1200-1211
- Hida N, Awais M, Takeuchi M, Ueno N, Tashiro M, Takagi C, Singh T, Hayashi M, Ohmiya Y, Ozawa T (2009) High-sensitivity real-time imaging of dual protein-protein interactions in living subjects using multicolor luciferases. *PLoS One* **4**: e5868
- Hjorth E, Hadfi K, Zauner S, Maier UG (2005) Unique genetic compartmentalization of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **579**: 1129-1135
- Huang H, Choi SY, Frohman MA (2010) A quantitative assay for mitochondrial fusion using Renilla luciferase complementation. *Mitochondrion* **10**: 559-566
- Hudson EN, Weber G (1973) Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. *Biochemistry* **12**: 4154-4161
- Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 7606-7611

Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947-962

Johansson C, Roos AK, Montano SJ, Sengupta R, Filippakopoulos P, Guo K, von Delft F, Holmgren A, Oppermann U, Kavanagh KL (2010) The Crystal structure of human GLRX5: iron sulphur cluster coordination, tetrameric assembly and monomer activity. *The Biochemical journal*

Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual review of biochemistry* **74**: 247-281

Kabil O, Motl N, Banerjee R (2014) H₂S and its role in redox signaling. *Biochimica et biophysica acta* **1844**: 1355-1366

Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 579-592

Kaplan CD, Kaplan J (2009) Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chemical reviews* **109**: 4536-4552

Kaut A, Lange H, Diekert K, Kispal G, Lill R (2000) Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *The Journal of biological chemistry* **275**: 15955-15961

Kerfeld CA, Salmeen AE, Yeates TO (1998) Crystal structure and possible dimerization of the high-potential iron-sulfur protein from *Chromatium purpuratum*. *Biochemistry* **37**: 13911-13917

Kiley PJ, Storz G (2004) Exploiting thiol modifications. *PLoS biology* **2**: e400

Kim JH, Bothe JR, Frederick RO, Holder JC, Markley JL (2014) Role of IscX in iron-sulfur cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society* **136**: 7933-7942

Kim KD, Chung WH, Kim HJ, Lee KC, Roe JH (2010) Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochemical and biophysical research communications* **392**: 467-472

Kimura H (2014) Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules* **19**: 16146-16157

Kimura H (2015) Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* **91**: 131-159

Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *The EMBO journal* **18**: 3981-3989

Klinge S, Hirst J, Maman JD, Krude T, Pellegrini L (2007) An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nature structural & molecular biology* **14**: 875-877

Kumanovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D, Ward DM, Kaplan J (2008) Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *The Journal of biological chemistry* **283**: 10276-10286

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1050-1055

- Lauriere M (1993) A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Analytical biochemistry* **212**: 206-211
- Layer G, Gaddam SA, Ayala-Castro CN, Ollagnier-de Choudens S, Lascoux D, Fontecave M, Outten FW (2007) SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *The Journal of biological chemistry* **282**: 13342-13350
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*
- Leichert LI (2010) Quantitative detection of the cysteine redox state in vivo : the OxICAT method. *Methods in redox signaling*: 63-70
- Li H, Mapolelo DT, Dingra NN, Naik SG, Lees NS, Hoffman BM, Riggs-Gelasco PJ, Huynh BH, Johnson MK, Outten CE (2009) The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* **48**: 9569-9581
- Li J, Cowan JA (2015) Glutathione-coordinated [2Fe-2S] cluster: a viable physiological substrate for mitochondrial ABCB7 transport. *Chemical communications* **51**: 2253-2255
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838
- Lill R, Dutkiewicz R, Freibert SA, Heidenreich T, Mascarenhas J, Netz DJ, Paul VD, Pierik AJ, Richter N, Stumpfig M, Srinivasan V, Stehling O, Muhlenhoff U (2015) The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *European journal of cell biology*
- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Muhlenhoff U (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 1491-1508
- Lill R, Muhlenhoff U (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual review of biochemistry* **77**: 669-700
- Lill R, Srinivasan V, Muhlenhoff U (2014) The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron-sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation. *Current opinion in microbiology* **22**: 111-119
- Lindemann C, Leichert LI (2012) Quantitative redox proteomics: the NOxICAT method. *Methods in molecular biology* **893**: 387-403
- Linderholm AL, Findleton CL, Kumar G, Hong Y, Bisson LF (2008) Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **74**: 1418-1427
- Liu L, Nogi T, Kobayashi M, Nozawa T, Miki K (2002) Ultrahigh-resolution structure of high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **58**: 1085-1091
- Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6803-6808
- Loening AM, Fenn TD, Gambhir SS (2007) Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. *Journal of molecular biology* **374**: 1017-1028
- Longen S, Woellhaf MW, Petrungaro C, Riemer J, Herrmann JM (2014) The disulfide relay of the intermembrane space oxidizes the ribosomal subunit mrp10 on its transit into the mitochondrial matrix. *Developmental cell* **28**: 30-42

- Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 4438-4442
- Magliery TJ, Wilson CG, Pan W, Mishler D, Ghosh I, Hamilton AD, Regan L (2005) Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **127**: 146-157
- Makmura L, Hamann M, Areopagita A, Furuta S, Munoz A, Momand J (2001) Development of a sensitive assay to detect reversibly oxidized protein cysteine sulfhydryl groups. *Antioxidants & redox signaling* **3**: 1105-1118
- Manicki M, Majewska J, Ciesielski S, Schilke B, Blenska A, Kominek J, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R (2014) Overlapping binding sites of the frataxin homologue assembly factor and the heat shock protein 70 transfer factor on the Isu iron-sulfur cluster scaffold protein. *The Journal of biological chemistry* **289**: 30268-30278
- Mansy SS, Xiong Y, Hemann C, Hille R, Sundaralingam M, Cowan JA (2002) Crystal structure and stability studies of C77S HiPIP: a serine ligated [4Fe-4S] cluster. *Biochemistry* **41**: 1195-1201
- Matthews JC, Hori K, Cormier MJ (1977) Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry* **16**: 85-91
- Michnick SW, Ear PH, Manderson EN, Remy I, Stefan E (2007) Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nature reviews. Drug discovery* **6**: 569-582
- Mishanina TV, Libiad M, Banerjee R (2015) Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nature chemical biology* **11**: 457-464
- Modis K, Bos EM, Calzia E, van Goor H, Coletta C, Papapetropoulos A, Hellmich MR, Radermacher P, Bouillaud F, Szabo C (2014) Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and therapeutic aspects. *British journal of pharmacology* **171**: 2123-2146
- Molik S, Lill R, Muhlenhoff U (2007) Methods for studying iron metabolism in yeast mitochondria. *Methods in cell biology* **80**: 261-280
- Moraes CT, Diaz F, Barrientos A (2004) Defects in the biosynthesis of mitochondrial heme c and heme a in yeast and mammals. *Biochimica et biophysica acta* **1659**: 153-159
- Mortimer RK, Johnston JR (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35-43
- Mueller EG (2006) Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nature chemical biology* **2**: 185-194
- Muhlenhoff U, Balk J, Richhardt N, Kaiser JT, Sipos K, Kispal G, Lill R (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of biological chemistry* **279**: 36906-36915
- Muhlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R (2003) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *The EMBO journal* **22**: 4815-4825
- Muhlenhoff U, Gerl MJ, Flaeger B, Pirner HM, Balser S, Richhardt N, Lill R, Stolz J (2007) The ISC [corrected] proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in Saccharomyces cerevisiae. *Eukaryotic cell* **6**: 495-504
- Muhlenhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, Zhang Y, Stubbe J, Pierrel F, Herrero E, Lillig CH, Lill R (2010) Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell metabolism* **12**: 373-385

- Muhlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ, Lill R (2011) Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *The Journal of biological chemistry* **286**: 41205-41216
- Mumberg D, Muller R, Funk M (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic acids research* **22**: 5767-5768
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* **417**: 1-13
- Murphy MP (2012) Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxidants & redox signaling* **16**: 476-495
- Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, Uzarska MA, Arranz JA, Del Toro M, Labayru MT, Landa J, Font A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Ugarte M, Gutierrez-Solana LG, Campistol J, Garcia-Cazorla A, Vaquerizo J, Riudor E, Briones P, Elpeleg O, Ribes A, Lill R (2011) A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *American journal of human genetics* **89**: 656-667
- NEB. Guidelines for PCR Optimization with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. New England Biolabs, Ipswich, MA, USA.
- Netz DJ, Pierik AJ, Stumpfig M, Bill E, Sharma AK, Pallesen LJ, Walden WE, Lill R (2012a) A bridging [4Fe-4S] cluster and nucleotide binding are essential for function of the Cfd1-Nbp35 complex as a scaffold in iron-sulfur protein maturation. *The Journal of biological chemistry* **287**: 12365-12378
- Netz DJ, Pierik AJ, Stumpfig M, Muhlenhoff U, Lill R (2007) The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nature chemical biology* **3**: 278-286
- Netz DJ, Stith CM, Stumpfig M, Kopf G, Vogel D, Genau HM, Stodola JL, Lill R, Burgers PM, Pierik AJ (2012b) Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nature chemical biology* **8**: 125-132
- Netz DJ, Stumpfig M, Dore C, Muhlenhoff U, Pierik AJ, Lill R (2010) Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nature chemical biology* **6**: 758-765
- Nogi T, Fathir I, Kobayashi M, Nozawa T, Miki K (2000) Crystal structures of photosynthetic reaction center and high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*: thermostability and electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13561-13566
- Ohashi K, Mizuno K (2014) A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. *Methods in molecular biology* **1174**: 247-262
- Orij R, Postmus J, Ter Beek A, Brul S, Smits GJ (2009) In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* **155**: 268-278
- Pallesen LJ, Solodovnikova N, Sharma AK, Walden WE (2013) Interaction with Cfd1 increases the kinetic lability of FeS on the Nbp35 scaffold. *The Journal of biological chemistry* **288**: 23358-23367
- Parent A, Elduque X, Cornu D, Belot L, Le Caer JP, Grandas A, Toledano MB, D'Autreaux B (2015) Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nature communications* **6**: 5686
- Paul VD, Lill R (2014) SnapShot: eukaryotic Fe-S protein biogenesis. *Cell metabolism* **20**: 384-384 e381
- Paul VD, Lill R (2015) Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochimica et biophysica acta* **1853**: 1528-1539

- Paulmurugan R, Gambhir SS (2003) Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Analytical chemistry* **75**: 1584-1589
- Pelzer W, Muhlenhoff U, Diekert K, Siegmund K, Kispal G, Lill R (2000) Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS letters* **476**: 134-139
- Pierik AJ, Netz DJ, Lill R (2009) Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nature protocols* **4**: 753-766
- Pierrel F, Hamelin O, Douki T, Kieffer-Jaquinod S, Muhlenhoff U, Ozeir M, Lill R, Fontecave M (2010) Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. *Chemistry & biology* **17**: 449-459
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Van Hoewyk D, Ye H, Pilon-Smits EA (2006) Biogenesis of iron-sulfur cluster proteins in plastids. *Genetic engineering* **27**: 101-117
- Pondarre C, Antiochos BB, Campagna DR, Clarke SL, Greer EL, Deck KM, McDonald A, Han AP, Medlock A, Kutok JL, Anderson SA, Eisenstein RS, Fleming MD (2006) The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Human molecular genetics* **15**: 953-964
- Prischi F, Konarev PV, Iannuzzi C, Pastore C, Adinolfi S, Martin SR, Svergun DI, Pastore A (2010) Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nature communications* **1**: 95
- Promega. (2011) Renilla-Glo™ Luciferase Assay System - INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS E2710, E2720, AND E2750. Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA.
- Pugh RA, Honda M, Leesley H, Thomas A, Lin Y, Nilges MJ, Cann IK, Spies M (2008) The iron-containing domain is essential in Rad3 helicases for coupling of ATP hydrolysis to DNA translocation and for targeting the helicase to the single-stranded DNA-double-stranded DNA junction. *The Journal of biological chemistry* **283**: 1732-1743
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Seraphin B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**: 218-229
- Pujol-Carrion N, Belli G, Herrero E, Nogues A, de la Torre-Ruiz MA (2006) Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* **119**: 4554-4564
- Py B, Barras F (2010) Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nature reviews Microbiology* **8**: 436-446
- Py B, Gerez C, Angelini S, Planel R, Vinella D, Loiseau L, Talla E, Brochier-Armanet C, Garcia Serres R, Latour JM, Ollagnier-deChoudens S, Fontecave M, Barras F (2012) Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe-S carrier. *Molecular microbiology* **86**: 155-171
- Qi W, Li J, Chain CY, Pasquevich GA, Pasquevich AF, Cowan JA (2012) Glutathione complexed Fe-S centers. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 10745-10748
- Qi W, Li J, Cowan JA (2014) A structural model for glutathione-complexed iron-sulfur cluster as a substrate for ABCB7-type transporters. *Chemical communications* **50**: 3795-3798
- Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox biology* **1**: 304-312
- Rees DC (2002) Great metallocusters in enzymology. *Annual review of biochemistry* **71**: 221-246
- Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP (2010) Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *The FEBS journal* **277**: 1465-1480

- Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L (2008) Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of experimental botany* **59**: 3781-3801
- Robinson KM, Lemire BD (1995) Flavinylation of succinate: ubiquinone oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **260**: 34-51
- Roche B, Aussel L, Ezraty B, Mandin P, Py B, Barras F (2013) Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochimica et biophysica acta* **1827**: 455-469
- Rodriguez-Manzanique MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**: 8180-8190
- Roret T, Tsan P, Couturier J, Zhang B, Johnson MK, Rouhier N, Didierjean C (2014) Structural and spectroscopic insights into BolA-glutaredoxin complexes. *The Journal of biological chemistry* **289**: 24588-24598
- Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of cell biology* **196**: 801-810
- Sabharwal SS, Schumacker PT (2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature reviews. Cancer* **14**: 709-721
- Salinovich O, Montelaro RC (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* **156**: 341-347
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning - A laboratory manual, 3rd edition*, 3rd edn. ColdSpring Harbour, USA: CSH Laboratory Press.
- Sau AK, Chen CA, Cowan JA, Mazumdar S, Mitra S (2001) Steady-state and time-resolved fluorescence studies on wild type and mutant chromatinium vinosum high potential iron proteins: holo- and apo-forms. *Biophysical journal* **81**: 2320-2330
- Schaedler TA, Thornton JD, Kruse I, Schwarzlander M, Meyer AJ, van Veen HW, Balk J (2014) A conserved mitochondrial ATP-binding cassette transporter exports glutathione polysulfide for cytosolic metal cofactor assembly. *The Journal of biological chemistry* **289**: 23264-23274
- Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E (1999) Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10206-10211
- Sharma AK, Pallesen LJ, Spang RJ, Walden WE (2010) Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *The Journal of biological chemistry* **285**: 26745-26751
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJ, Kerscher S, Elsasser HP, Wittig I, Balk J, Brandt U, Lill R (2009) Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Molecular and cellular biology* **29**: 6059-6073
- Sheftel AD, Wilbrecht C, Stehling O, Niggemeyer B, Elsasser HP, Muhlenhoff U, Lill R (2012) The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Molecular biology of the cell* **23**: 1157-1166
- Sherman F (2002) Getting started with yeast. *Methods in enzymology* **350**: 3-41
- Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R, Kispal G (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *The Journal of biological chemistry* **277**: 26944-26949

- Smith AD, Agar JN, Johnson KA, Frazzon J, Amster IJ, Dean DR, Johnson MK (2001) Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **123**: 11103-11104
- Solmaz SR, Hunte C (2008) Structure of complex III with bound cytochrome c in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer. *The Journal of biological chemistry* **283**: 17542-17549
- Srinivasan V, Netz DJ, Weibert H, Mascarenhas J, Pierik AJ, Michel H, Lill R (2007) Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure* **15**: 1246-1257
- Srinivasan V, Pierik AJ, Lill R (2014) Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science* **343**: 1137-1140
- Stehling O, Mascarenhas J, Vashisht AA, Sheftel AD, Niggemeyer B, Rosser R, Pierik AJ, Wohlschlegel JA, Lill R (2013) Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B integrate iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins. *Cell metabolism* **18**: 187-198
- Stehling O, Vashisht AA, Mascarenhas J, Jonsson ZO, Sharma T, Netz DJ, Pierik AJ, Wohlschlegel JA, Lill R (2012) MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* **337**: 195-199
- Strain J, Lorenz CR, Bode J, Garland S, Smolen GA, Ta DT, Vickery LE, Culotta VC (1998) Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *The Journal of biological chemistry* **273**: 31138-31144
- Stryer L, Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (2010) *Biochemie*, Vol. 6.
- Sundquist T. (2011) Dual-Luciferase or Dual-Glo Luciferase Assay System? Which one should I choose for my reporter assays?
- Syrový I, Hodný Z (1991) Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of chromatography* **569**: 175-196
- Szabo C, Ransy C, Modis K, Andriamihaja M, Murghes B, Coletta C, Olah G, Yanagi K, Bouillaud F (2014) Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *British journal of pharmacology* **171**: 2099-2122
- Thorne N, Inglese J, Auld DS (2010) Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chemistry & biology* **17**: 646-657
- Tonduti D, Dorboz I, Imbard A, Slama A, Boutron A, Pichard S, Elmaleh M, Vallee L, Benoist J, Ogier H, Boespflug-Tanguy O (2015) New spastic paraplegia phenotype associated to mutation of NFU1. *Orphanet journal of rare diseases* **10**: 13
- Tsai CL, Barondeau DP (2010) Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**: 9132-9139
- Uzarska MA, Dutkiewicz R, Freibert SA, Lill R, Muhlenhoff U (2013) The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Molecular biology of the cell* **24**: 1830-1841
- Vilella F, Alves R, Rodriguez-Manzanique MT, Belli G, Swaminathan S, Sunnerhagen P, Herrero E (2004) Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comparative and functional genomics* **5**: 328-341
- Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J, Volbeda A, Fontecilla-Camps JC, Theil EC, Volz K (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* **314**: 1903-1908

- Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS (2006) Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1763**: 668-689
- Webert H (2011) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der eukaryotischen Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese-Maschinerie Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, Marburg
- Webert H, Freibert SA, Gallo A, Heidenreich T, Linne U, Amlacher S, Hurt E, Muhlenhoff U, Banci L, Lill R (2014) Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nature communications* **5**: 5013
- Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF (2014) Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* **468**: 790-795
- West RW, Jr., Yocum RR, Ptashne M (1984) *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Molecular and cellular biology* **4**: 2467-2478
- Wiedemann N, Urzica E, Guiard B, Muller H, Lohaus C, Meyer HE, Ryan MT, Meisinger C, Muhlenhoff U, Lill R, Pfanner N (2006) Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *The EMBO journal* **25**: 184-195
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology* **112**: 531-552
- Willems P, Wanschers BF, Esseling J, Szklarczyk R, Kudla U, Duarte I, Forkink M, Nooteboom M, Swarts H, Gloerich J, Nijtmans L, Koopman W, Huynen MA (2013) BOLA1 is an aerobic protein that prevents mitochondrial morphology changes induced by glutathione depletion. *Antioxidants & redox signaling* **18**: 129-138
- Woo J, Howell MH, von Arnim AG (2008) Structure-function studies on the active site of the coelenterazine-dependent luciferase from Renilla. *Protein science : a publication of the Protein Society* **17**: 725-735
- Xu XM, Moller SG (2011) Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance. *Antioxidants & redox signaling* **15**: 271-307
- Zheng L, Baumann U, Reymond JL (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic acids research* **32**: e115
- Zheng L, Dean DR (1994) Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *The Journal of biological chemistry* **269**: 18723-18726

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
C-Terminus	Carboxyterminus
CIA	<i>cytosolic iron-sulfur-protein assembly</i>
CTD-hRluc	C-terminale Domäne <i>Renilla</i> Luciferase
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
Fe/S	Eisen-Schwefel
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
GSH	Glutathion
hRluc	<i>Renilla</i> Luciferase
IP	Immunpräzipitation
ISC	<i>iron-sulfur-cluster assembly</i>
MS	Massenspektrometrie
N-Terminus	Aminoterninus
NADH + H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADPH + H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NTD-hRluc	N-terminale Domäne der <i>Renilla</i> Luciferase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SC	<i>synthetic complete</i> (Minimalmedium)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
U	<i>Unit</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
YP	<i>Yeast peptone</i> (Vollmedium)

Liste Hefestämme Teilprojekt II

Analyse der Interaktionsdynamik der Teilkomponenten der späten ISC-Maschinerie mit Hilfe eines *Renilla* Split-Luciferase-Testsystems

Stamm	Genotyp	PCR-Fragment aus Vektor
W303-1A	MATa; ade 2-1, his 3-11,15, leu 2-3,112, trp 1-1, ura 3-1, can 1-100	
aco1Δ, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; aco1Δ::HIS3; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
aco1Δ, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; aco1Δ::HIS3; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
aco1Δ, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; aco1Δ::natNT2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
aco1Δ, IBA57CTD	W303-1A; aco1Δ::HIS3; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
aco1Δ, ISA1CTD	W303-1A; aco1Δ::HIS3; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
aco1Δ, ISA2CTD	W303-1A; aco1Δ::HIS3; ISA2C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
aco1Δ, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; aco1Δ::HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
aco1Δ, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; aco1Δ::HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
aco1Δ, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; aco1Δ::natNT2; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
BIO2CTD, NFU1NTD	W303-1A; NFU1C::NTD(hRluc) kanMX4; BIO2C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
CIA1NTD	W303-1A; CIA1C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
CIA1NTD, CFD1CTD	W303-1A; CIA1C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
CIA1NTD, CIA2CTD	W303-1A; CIA1C::NTD(hRluc) kanMX4; CIA2C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
CIA1NTD, CIA2CTD	W303-1A; CIA1C::NTD(hRluc) kanMX4; CIA2C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
CIA1NTD, NAR1CTD	W303-1A; CIA1C::NTD(hRluc) kanMX4; NAR1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal ARH1, IDH1CTD, IDH2NTD	W303-1A; pARH1::Gal1-10 natNT2; IDH2C::NTD(hRluc) kanMX4; IDH1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal GRX5, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; pGRX5::Gal1-10 HIS3; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal GRX5, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; pGRX5::Gal1-10 HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal IBA57, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; pIBA57::Gal1 natNT2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal IBA57, IBA57NTD	W303-1A; pISA2::Gal1-10 LEU2; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal IBA57, ISA1NTD	W303-1A; pIBA57::Gal1 natNT2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal IBA57, ISA2NTD	W303-1A; pIBA57::Gal1 natNT2; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal IBA57, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; pIBA57::Gal1 natNT2; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal ISA1, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; pISA1::Gal1-10 HIS3; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal ISA1, IBA57NTD	W303-1A; pISA2::Gal1-10 LEU2; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal ISA1, ISA1NTD	W303-1A; pISA1::Gal1-10 HIS3; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal ISA1, ISA2NTD	W303-1A; pISA1::Gal1-10 HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal ISA1, ISA2NTD	W303-1A; pISA1::Gal1-10 HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD

		HRLUC
Gal ISA1, ISA2NTD, IBA57CTD	W303-1A; pISA1:::(Gal1-10) HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal ISA1, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; pISA1:::(Gal1-10) HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal ISA2, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; pISA2:::(Gal1-10) LEU2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal ISA2, IBA57NTD	W303-1A; pISA2:::(Gal1-10) LEU2; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal ISA2, ISA1NTD	W303-1A; pISA2:::(Gal1-10) LEU2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal ISA2, ISA2NTD	W303-1A; pISA2:::(Gal1-10) LEU2; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
Gal ISA2, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; pISA2:::(Gal1-10) LEU2; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal SSQ1, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; pSSQ1:::(Gal1-10) HIS3; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
Gal SSQ1, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; pSSQ1:::(Gal1-10) HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GalL ARH1, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; pARH1:::(GalL) natNT2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GalL ARH1, ISA1NTD, IBA57CTD *	W303-1A; pARH1:::(GalL) natNT2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GalL ARH1, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; pARH1:::(GalL) natNT2; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GalL CFD1, NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; pCFD1:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL CIA1, NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; pCIA1:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL Dre2, NBP35NTD	W303-1A; pDRE2:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL DRE2, NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; pDRE2:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL NBP35, NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; pNBP35:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL NBP35, NBP35NTD, CIA1CTD	W303-1A; pNBP35:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CIA1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL NFS1, NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; pNFS1:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL NSF1, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; pNSF1:::(GalL) natNT2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GalL NSF1, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; pNSF1:::(GalL) natNT2; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GalL RAD3, NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; pRAD3:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL SSQ1, IDH2NTD, IDH1CTD	W303-1A; pGRX5:::(Gal1-10) HIS3; IDH2C::NTD(hRluc) KanMX5; IDH1::CTD(hRluc) URA3	pFA6a HIS3 Gal; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GalL TAH18, NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; pTAH18:::(GalL) natNT2; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
GalL YAH1, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; pYAH1:::(GalL) natNT2; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GalL YAH1, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; pYAH1:::(GalL) natNT2; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pYM N27 natNT2; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
grx5Δ, ISA1CTD	W303-1A; grx5Δ::kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
grx5Δ, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; grx5Δ::kanMX4; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
grx5Δ, ISD11CTD	W303-1A; grx5Δ::kanMX4; ISD11C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
GRX5CTD	W303-1A; GRX5C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
GRX5CTD, NFU1NTD	W303-1A; NFU1C::NTD(hRluc) kanMX4; GRX5C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
iba57Δ, IBA57CTD	W303-1A; iba57Δ::natNT2; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
iba57Δ, ISA1CTD	W303-1A; iba57Δ:: natNT2; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC

iba57Δ, ISA2CTD	W303-1A; iba57Δ::natNT2; ISA2C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
IBA57CTD	W303-1A; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
IBA57CTD, BIO2NTD	W303-1A; BIO2C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57CTD, LIP5NTD	W303-1A; LIP5C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57CTD, SDH2NTD	W303-1A; SDH2C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57NTD	W303-1A; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4	pUG72 CTD HRLUC
IBA57NTD, GRX5CTD	W303-1A; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4; GRX5C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57NTD, IDH1CTD	W303-1A; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4; IDH1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57NTD, ISA1CTD	W303-1A; IBA57C::NTD(hRluc) LEU2; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pUG73 NTD HRLUC
IBA57NTD, ISA1CTD	W303-1A; IBA57C::NTD(hRluc) LEU2; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pUG73 NTD HRLUC
IBA57NTD, JAC1CTD	W303-1A; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4; JAC1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57NTD, NFU1CTD	W303-1α; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4; NFU1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57NTD, SSQ1CTD	W303-1A; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4; SSQ1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57NTD, YAH1CTD	W303-1α; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4; YAH1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IBA57NTD, YAL046CCTD	W303-1α; IBA57C::NTD(hRluc) kanMX4; YAL046CC::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
IDH2NTD	W303-1A; IDH2C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
IDH2NTD, IDH1CTD	W303-1A; IDH2C::NTD(hRluc) KanMX5; IDH1::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
IDH2NTD, IDH1CTD	W303-1A; IDH2C::NTD(hRluc) KanMX5; IDH1::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA1CTD	W303-1A; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
ISA1CTD	W303-1A; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
ISA1CTD, BIO2NTD	W303-1A; BIO2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA1CTD, LIP5NTD	W303-1A; LIP5C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA1CTD, SDH2NTD	W303-1A; SDH2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA1NTD	W303-1A; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA1NTD	W303-1A; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA1NTD, GRX5CTD	W303-1A; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; GRX5C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA1NTD, IDH1CTD	W303-1A; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IDH1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA1NTD, ISD11CTD	W303-1A; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; ISD11C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA1NTD, JAC1CTD	W303-1A; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; JAC1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA1NTD, NFU1CTD	W303-1α; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; NFU1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA1NTD, SSQ1CTD	W303-1A; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; SSQ1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA2CTD	W303-1A; ISA2C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
ISA2CTD, BIO2NTD	W303-1A; BIO2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA2C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA2CTD, LIP5NTD	W303-1A; LIP5C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA2C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC

ISA2CTD, SDH2NTD	W303-1A; SDH2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA2C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA2NTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA2NTD, GRX5CTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; GRX5C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) LEU2; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pUG73 NTD HRLUC
ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) LEU2; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pUG73 NTD HRLUC
ISA2NTD, ISD11CTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISD11C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISA2NTD, NFU1CTD	W303-1α; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; NFU1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA2NTD, SSQ1CTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; SSQ1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA2NTD, YAH1CTD	W303-1A; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; YAH1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISA2NTD, YAL046CCTD	W303-1α; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; YAL046C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISD11CTD	W303-1A; ISD11C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
ISD11CTD, BIO2NTD	W303-1A; BIO2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISD11C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISD11CTD, LIP5NTD	W303-1A; LIP5C::NTD(hRluc) kanMX4; ISD11C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
ISD11CTD, SDH2NTD	W303-1A; SDH2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISD11C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
isu1Δ, ISA1NTD, IBA57CTD	W303-1A; isu1Δ::HIS3; ISA1C::NTD(hRluc) kanMX4; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
isu1Δ, IBA57CTD	W303-1A; isu1Δ::HIS3; IBA57C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
isu1Δ, ISA1CTD	W303-1A; isu1Δ::HIS3; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
isu1Δ, ISA2CTD	W303-1A; isu1Δ::HIS3; ISA2C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
isu1Δ, ISA2NTD, ISA1CTD	W303-1A; isu1Δ::HIS3; ISA2C::NTD(hRluc) kanMX4; ISA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
ISU2CTD, NFU1NTD	W303-1A; NFU1C::NTD(hRluc) kanMX4; ISU2C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
JAC1CTD, NFU1NTD	W303-1A; NFU1C::NTD(hRluc) kanMX4; JAC1C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
LIP5CTD, NFU1NTD	W303-1A; NFU1C::NTD(hRluc) kanMX4; LIP5C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
NAR1NTD	W303-1A; NAR1C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
NBP35NTD	W303-1A; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
NBP35NTD, CFD1CTD	W303-1A; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CFD1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
NBP35NTD, CIA1CTD	W303-1A; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CIA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC ; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
NBP35NTD, CIA1CTD	W303-1A; NBP35C::NTD(hRluc) kanMX4; CIA1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC; pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
NFU1CTD	W303-1α; NFU1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
NFU1CTD	W303-1A; NFU1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
NFU1NTD	W303-1A; NFU1C::NTD(hRluc) kanMX4	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
SDH2CTD, NFU1NTD	W303-1A; NFU1C::NTD(hRluc) kanMX4; SDH2C::CTD(hRluc) URA3	pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
YAH1CTD	W303-1α; YAH1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC
YAH1CTD	W303-1A; YAH1C::CTD(hRluc) URA3	pUG72 CTD HRLUC

YAH1CTD, BIO2NTD	W303-1A; BIO2C::NTD(hRluc) kanMX4; YAH1C::CTD(hRluc) URA3 pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
YAH1CTD, ISU2NTD	W303-1A; ISU2C::NTD(hRluc) kanMX4; YAH1C::CTD(hRluc) URA3 pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
YAH1CTD, JAC1NTD	W303-1A; JAC1C::NTD(hRluc) kanMX4; YAH1C::CTD(hRluc) URA3 pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
YAH1CTD, LIP5NTD	W303-1A; LIP5C::NTD(hRluc) kanMX4; YAH1C::CTD(hRluc) URA3 pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
YAH1CTD, SDH2NTD	W303-1A; SDH2C::NTD(hRluc) kanMX4; YAH1C::CTD(hRluc) URA3 pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
YAL044W-ACTD	W303-1A; YAL044W-AC::CTD(hRluc) URA3 pUG72 CTD HRLUC
Yal046CCTD	W303-1A; YAL046CC::CTD(hRluc) URA3 pUG72 CTD HRLUC
YAL046CNTD	W303-1A; YAL046CC::NTD(hRluc) kanMX4 pFA6a kanMX4 NTD HRLUC
YAL046CNTD, YAL044W-ACTD	W303-1A; YAL046CC::NTD(hRluc) kanMX4; YAL044W-AC::CTD(hRluc) URA3 pFA6a kanMX4 NTD HRLUC; pUG72 CTD HRLUC
YFH1CTD	W303-1A; YFH1C::CTD(hRluc) URA3 pUG72 CTD HRLUC

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Achim Aigner, Holger Bastians, Stefan Bauer, Stephan Becker, Alexander Brehm, Erhard Bremer, Frank Bremmer, Sabine Müller-Brüsselbach, Andreas Burchert, Frank Czubayko, Jürgen Daut, Niels Decher, Markus Eickmann, Martin Eilers, Hans-Peter Elsässer, Barbara Fritz, Holger Garn, Wolfgang Garten, Frank Glorius, Karl-Heinz Grzeschik, Andrej Hasilik, Monika Hassel, Gerhard Hilt, Ralf Jacob, Hartmut Jungclas, Jan Koolman, Roland Lill, Christopher Horst Lillig, Helga Lohöfer, Michael Lohoff, Georg Lüers, Andrea Maisner, Roland Moll, Ulrich Mühlenhoff, Dominik Oliver, Wolfgang Petz, Timothy David Plant, Regina Preisig-Müller, Adriana del Rey, Klaus-Heinrich Röhm, Martin Schäfer, Guntram Suske, Michael Vollmer, Reiner Westermann, Christian Wrocklage

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt zuallererst Herrn PD Dr. Ulrich Mühlenhoff und Herrn Prof. Dr. Roland Lill für ihre engagierte Betreuung, zahlreiche fachliche Diskussionen, Ratschläge und Hilfestellungen im Verlauf der Anfertigung dieser Arbeit im Institut für Zytobiologie und Zytopathologie. Beide Betreuer fanden stets Zeit, mich ratend zu begleiten. Besonders dankbar bin ich außerdem für die Möglichkeit, dass ich mir ein breites Methodenspektrum aneignen konnte.

Zudem gilt mein besonders herzlicher Dank unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Lars I. Leichert vom Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum, in dessen Arbeitsgruppe ich massenspektrometrische Messungen eigenständig auszuführen und auszuwerten lernte, und dies letztendlich entscheidend zum Gelingen meines ersten Dissertationsprojektes beitrug. Ich danke auch seiner Arbeitsgruppe, dass sie mich stets freundschaftlich integriert und mir somit schöne Forschungsaufenthalte in Bochum gewährleistet haben.

Ferner gilt ebenfalls ein herzliches Dankeschön Prof. Dr. Uwe Maier für die selbstverständliche Bereitschaft zur Übernahme der Aufgabe des Zweitkorrektors und für eine tolle Zeit im Graduiertenkolleg 1216 „Intra- and Intercellular Transport and Communication“. Herr Maier und Frau Lucette Claudet waren stets für mich da und kümmerten sich herzlich um die Doktoranden in der Graduiertenschulung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der gesamten AG Lill für eine gute Zusammenarbeit und die schöne Arbeitsatmosphäre. An dieser Stelle möchte ich auch Kathleen Hübner meinen persönlichen Dank ausrichten für ihre Arbeiten als studentische Hilfskraft im Rahmen des zweiten Teilprojektes meiner Dissertation.

Außerdem danke ich den ganzen Mitarbeitern des Instituts für Zytobiologie und Zytopathologie für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und das sehr gute Miteinander in allen Situationen. Ein besonderer Dank geht hier auch an meinen Laborkollegen Christian Wolfgang Weinhold Schink, der mich freundschaftlich während der Zeit meiner Dissertation unterstützte und stets für ein angenehmes Arbeitsklima sorgte. In diesem Zusammenhang möchte ich an dieser Stelle auch noch explizit Ellena Hönig, Martin und Claudia Stümpfig, Bastian Hoffmann, Nils Herleht und Daniel Becker für ihre Freundschaft und die schöne Zeit im Institut für Zytobiologie und Zytopathologie danken.

Schließlich möchte ich mich im Besonderen bei meinen Eltern bedanken, die mich im Verlauf des Studiums und während meiner Dissertation sehr unterstützt haben.